ACADÉMIE DE MONTPELLIER

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THESE

présentée à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc
pour obtenir le grade de Docteur d'Etat — Mention SCIENCES

RECHERCHES SUR LES MALADIES INFECTIEUSES DE DEUX ARACHNIDES.

ETUDE DE RICKETTSIOSES ET DE VIROSES CHEZ LE SCORPION *BUTHUS OCCITANUS* AM. ET L'ARAIGNEE *PISAURA MIRABILIS* CL.

par

Gilles MOREL

Soutenue le 10 Juillet 1979 devant la Commission d'Examen.

JURY : M. C. VAGO, Membre de l'Institut **Président**

M. R. LEGENDRE

M. G. DEVAUCHELLE

M. L. THALER

M. M. VACHON

ATELIER DUPLICATION
— U.S.T.L. —

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546012_0031

ACADÉMIE DE MONTPELLIER

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THESE

présentée à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc
pour obtenir le grade de Docteur d'Etat – Mention SCIENCES

RECHERCHES SUR LES MALADIES INFECTIEUSES DE DEUX ARACHNIDES.

ETUDE DE RICKETTSIOSES ET DE VIROSES CHEZ LE SCORPION *BUTHUS OCCITANUS* AM. ET L'ARAIGNEE *PISAURA MIRABILIS* CL.

par

Gilles MOREL

Soutenue le 10 Juillet 1979 devant la Commission d'Examen.

JURY : M. C. VAGO, Membre de l'Institut **Président**
M. R. LEGENDRE
M. G. DEVAUCHELLE
M. L. THALER
M. M. VACHON

ATELIER DUPLICATION
– U.S.T.L. –

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

U N I V E R S I T E
DES SCIENCES ET TECHNIQUES
DU LANGUEDOC

L I S T E D E S P R O F E S S E U R S

Président : L. THALER

Vices-Présidents :
MM. CORRIU, PIETRASANTA et NOUAZE.

Doyens Honoraires à l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc :
P. MATHIAS
B. CHARLES
A. CASADEVALL.

Président Honoraire :
P. DUMONTET.

Professeurs Honoraires de l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc

- R. JACQUES
- M. CASTERAS
- E. TURRIERE
- C. CAUQUIL
- G. DENIZOT
- J. GRANIER
- Ch. BOUHET
- J. SALVINIEN
- M. MOUSSERON
- P. CHATELAIN
- A.M. VERGNOUX
- E. KAHANE
- Ch. SAUVAGE
- J.M. MORETTI
- G. COUCHET
- P. DEMANGEON.

Secrétaire Général :
E. SIAU

Professeurs titulaires:

- M. J. AVIAS ..... Géologie
- M. JJ. MOREAU ..... Mécanique rationnelle

- M. B. CHARLES ..... Mathématiques Pures
- M. R. JOUTY ..... Physique
- M. R. LEGENDRE ..... Zoologie
- M. I. ASSENMACHER ..... Physiologie Animale
- M. Ch. ROUMIEU ..... Analyse supérieure
- M. J. ROBIN ..... Physique
- M. B. PISTOULET ..... Physique
- M. A. POTIER ..... Chimie Minérale
- M. R. LAFONT ..... Physique
- M. R. JACQUIER ..... Chimie
- M. J. FALGUEIRETTES..... Minéralogie
- M. J. REGNIER ..... Chimie
- Mme J. CHARLES ..... Mathématiques
- M. J. ROUZAUD ..... Chimie
- M. P. CAILLON ..... Physique
- M. H. CHRISTOL (*E.N.S.C.M.*) ..... Chimie
- M. H. ANDRILLAT ..... Astronomie
- Mme G. VERNET ..... Biologie Animale
- M. L. CECCHI ..... Physique
- M. L. EUZET ..... Zoologie
- M. C. DELOUPY ..... Physique
- M. M. MATTAUER ..... Géologie
- M. M. SAVELLI ..... Physique
- M. R. MARTY ..... Psychophysiologie
- M. A. BONNET ..... Botanique
- M. G. LAMATY ..... Chimie
- Mme S. ROBIN ..... Physique
- M. R. CORRIU ..... Chimie
- Mme N. PARIS ..... Physiologie Végétale
- M. J. ZARZYCKI ..... Sciences des Matériaux
- M. M. MAURIN ..... Chimie Minérale
- M. L. THALER ..... Paléontologie
- M. S. GROMB ..... Chimie Physique
- M. JV. ZANCHETTA ..... Chimie Générale
- M. P. SABATIER ..... Mathématiques
- M. F. SCHUE ..... Chimie Organique
- M. E. GROUBERT ..... Physique

- M. Ch. CASTAING ..... Mathématiques
- M. M. ROUZEYRE ..... Physique
- M. F. PROUST ..... Géologie
- M. J. PARIS ..... Biologie Animale
- M. A. GROTHENDIECK ..... Mathématiques
- M. C. DURANTE ..... Physique
- M. G. BOUGNOT ..... Physique
- M. G. LECOY ..... E. E. A.
- M. R. GAUFRES ..... Chimie
- M. JD BAYLE ..... Physiologie Animale
- M. JL IMBACH ..... Chimie
- M. JP FILLARD ..... E. E. A.
- M. N. ROBY ..... Mathématiques
- M. Ph JEANTEUR ..... Biochimie
- M. M. AMANIEU (*I.S.I.*) ..... Hydrologie et Mariculture
- M. A. COMMEYRAS ..... Chimie Organique

Professeurs sans Chaire :

- M. G. TOURNE ..... Chimie
- M. J. REMY ..... Géologie
- Mme H. GUASTALLA ..... Biologie physico-chimique
- M. R. LENEL ..... Biologie Animale
- M. A. BASSOMPIERRE ..... Physique
- M. R. JONARD ..... Botanique
- M. R. CANO (*I.U.T.*) ..... Mesures Physiques
- M. P. MOLINO ..... Mathématiques
- M. J. LEGRAND ..... Physiologie Animale
- M. J. D'AUZAC ..... Physiologie Végétale
- M. G. BOUIX ..... Zoologie
- M. M. DENIZOT ..... Biologie Végétale
- M. B. BRUN ..... Chimie Physique
- M. L. GIRAL ..... Chimie Organique
- M. JP QUIGNARD ..... Zoologie
- M. Ph VIALLEFONT ..... Chimie
- M. A. RAIBAUT ..... Zoologie

- M. P. VITSE ..... Chimie Minérale
- M. J. GRIMAUD (*E.N.S.C.M.*) ..... Chimie
- M. J. GARCIA (*I.U.T.-NIMES*) ..... Génie Mécanique
- M. P. LOUIS ..... Géophysique Appliquée
- M. Cl BOCQUILLON ..... Hydrologie
- M. A. DONNADIEU ..... Physique
- M. M. LEFRANC ..... Mathématiques
- M. G. MASCHERPA ..... Chimie
- M. C. GOUT ..... Physique
- M. JP TRILLES ..... Biologie Appliquée
- M. F. HALLE ..... Biologie Végétale
- M. G. BORDURE ..... Génie Electrique
- M. JP NOUGIER ..... Electronique
- M. M. GODRON ..... Ecologie Végétale
- M. L. LASSABATERE ..... E. E. A.
- M. J. LAPASSET ..... Physique - Mesure physiqu
- M. M. AVEROUS ..... Physique - Génie électri
- M. G. MAURY ..... Chimie
- M. G. LOUPIAS ..... Mathématiques
- M. R. BEN AIM (*I.S.I.*) ..... Génie chimique et Traitement des Eaux.

Professeurs Associés :

- M. M. MICALI ..... Mathématiques
- M. H. BILGER ..... Physique
- M. G. AUBERSON ..... Mathématiques.

Professeurs associés d'Université :

- M. L. DAUZIER ..... Physiologie Animale
- M. GALZY ..... Biochimie
- M. C. MAURIN ..... Biologie Animale
- M. R. SENOUILLET ..... Economie et Gestion
- M. E. SERVAT ..... Géologie
- M. C. VAGO ..... Biologie Animale
- Mme M. VAN CAMPO ..... Biologie Végétale
- M. E. VERDIER ..... Chimie
- M. F. WINTERNITZ ..... Chimie.

Maîtres de Conférences :

- M. R. HAKIM ..... Mathématiques
- M. F. LAPSCHER ..... Mathématiques
- M. J. CROUZET (*I.S.I*) ..... Biochimie Appliquée
- Mle M. LEVY (*I.U.T.*) ..... Chimie
- M. J. LAGARRIGUE (*I.U.T.*) ..... Biologie Appliquée
- M. Cl DROGUE (*I.S.I.*) ..... Hydrogéologie
- M. P. GENESTE (*E.N.S.C.M.*) ..... Chimie Physique Appliqu

- M. J. CHEFTEL (*I.S.I.*) ..... Biochimie Appliquée à l'Alimentation.

- M. Y. PIETRASANTA (*E.N.S.C.M.*) ..... Chimie Appliquée

- M. B. LEMAIRE (*I.S.I.*) ..... Mathématiques Appliquée Informatique.

- M. H. MATHIEU (*I.S.I.*) ..... E. E. A.
- M. M. VALADIER ..... Mathématiques
- M. JL ROBERT (*I.U.T. - NIMES*) ..... Génie électrique
- M. O. MAISONNEUVE ..... Mécanique
- M. R. BRUNEL ..... Physique
- M. M. CADENE ..... Physique
- M. P. DELORD ..... Physique
- M. A. PAVIA ..... Chimie
- M. JM BESSIERES ..... Chimie
- M. JP BARD ..... Géologie
- M. P. JOUANNA (*I.U.T. - NIMES*) ..... Génie Civil

- M. P. BESANCON (*I.S.I.*) ..... Physiologie de la nutrition appliquée à l'alimentation.

- M. Y. NOUAZE ..... Mathématiques
- M. J. PETRISSANS ..... Chimie

- M. JY GAL ..... Chimie analytique appliquée.

- M. C. BENOIT ..... Physique
- M. H. GIBERT (I.S.I.) ..... Génie Alimentaire
- M. A. LIEGEOIS (I.S.I.) ..... Automatique
- M. L. COT (E.N.S.C.M.) ..... Chimie
- M. B. TARODO DE LA FUENTE (I.S.I.) ..... Biochimie Appliquée et Techniques des Matière alimentaires.
- M. Y. ESCOUFIER ..... Informatique
- M. A. SANS ..... Psychophysiologie
- M. G. DURAND ..... Chimie
- M. B. FILLIATRE (I.S.I.) ..... Informatique et Gestio
- M. JJ MACHEIX ..... Physiologie Végétale
- M. P. HINZELIN ..... Génie Civil
- M. Cl BOKSENBAUM ..... Informatique
- M. G. CAMBON (I.S.I.) ..... E. E. A.
- M. J. FERRIE (I.S.I.) ..... Informatique
- M. E. AKUTOWICZ ..... Mathématiques
- M. D. AUVERGNE (I.S.I.) ..... E. E. A.
- M. B. LEBLEU ..... Biochimie

Maître de Conférences agrégé :

- M. R. REIX ..... Sciences de Gestion.

Maîtres de Conférences Associés :

Néant.

Chargé d'Enseignement :

Néant.

Chargé des fonctions de Maître de Conférences :

- M. G. SAUMADE (I.U.T.) ..... G. E. A. (Economie des entreprises).

Chargés de Cours :

- M. M. MOUTON (I.U.T.) ..... Economie et Gestion
- M. Ph FOUCOU (I.U.T.) ..... Sciences économiques.

AVANT-PROPOS

Avant d'exposer les résultats de mes recherches, je tiens à exprimer ma reconnaissance à tous ceux qui m'ont permis de les réaliser ou qui me font l'honneur de les juger.

J'exprime à Monsieur le Professeur LEGENDRE toute ma gratitude pour m'avoir accepté dans son laboratoire, dirigé et permis de mener à bien ce travail.

Je suis très heureux de manifester ma respectueuse gratitude à Monsieur le Professeur VAGO, Membre de l'Institut, qui me fait l'honneur de présider ce jury après m'avoir conseillé tout au long de mes recherches.

Je remercie Monsieur le Professeur DEVAUCHELLE avec qui j'ai eu des entretiens profitables et qui a bien voulu accepter de juger ce travail du point de vue d'un microbiologiste.

J'ai toujours trouvé auprès de Monsieur le Professeur VACHON le meilleur accueil et les encouragements les plus vifs. Il n'a pas hésité à me consacrer de précieux moments et je l'en remercie vivement.

Que Monsieur le Professeur THALER qui malgré ses nombreuses occupations a accepté de participer à ce jury et qui m'a hébergé dans son laboratoire lors de mon arrivée à Montpellier trouve ici mes sincères remerciements.

Je tiens à remercier tous mes collègues et amis des Laboratoires de Zoologie et de Pathologie comparée de l'U.S.T.L. ainsi que ceux de la Station de Recherches de Pathologie comparée de St Christol et du Laboratoire de Biogéographie de l'E.P.H.E.

Ces remerciements s'adressent plus particulièrement à Messieurs BONARIC, BERGOIN, CROIZIER, LOUIS, VEYRUNES et DUTHOIT ainsi qu'à Mme COMBES pour l'intérêt qu'ils ont pris à certains aspects de mes recherches et leur collaboration efficace.

Je ne saurais oublier M. J. ROUDIL et Mme AIMAR pour la patience dont ils ont fait preuve au cours de ces derniers mois ; je les remercie de la participation active qu'ils ont pris dans la réalisation de ce mémoire.

SOMMAIRE

Pages

INTRODUCTION..... 1

CHAPITRE I : LES MALADIES INFECTIEUSES DES ARACHNIDES..... 5

CHAPITRE II : LES RICKETTSIOSES ET LES VIROSES CHEZ LES ARTHROPODES..... 9

I - LES RICKETTSIOSES..... 9

II - LES VIROSES..... 16

CHAPITRE III : MATERIEL ET METHODES..... 19

(Entre les pages 29 et 31, Planches I à III)

CHAPITRE IV : ETUDE D'UNE RICKETTSIOSE CAUSEE PAR *POROCHLAMYDIA BUTHI* CHEZ LE SCORPION *BUTHUS OCCITANUS* AM..... 31

1) Pathogénie..... 32

2) Histopathologie..... 33

3) Microscopie électronique..... 34

4) Position systématique..... 39

(Entre les pages 41 et 43, Planches IV à VIII)

CHAPITRE V : ETUDE D'UNE RICKETTSIOSE CAUSEE PAR UN COMPLEXE *POROCHLAMYDIA BUTHI*-PHAGE CHEZ LE SCORPION *BUTHUS OCCITANUS* AM..... 43

1) Pathogénie et histopathologie..... 43

2) Microscopie électronique..... 45

3) Etude du virus..... 47

4) Discussion..... 49

(Entre les pages 51 et 53, Planches IX à XIII)

CHAPITRE VI : ETUDE DES RICKETTSIOSES DE L'ARAIGNEE *PISAURA MIRABILIS* CL..... 53

I - ETUDE DE LA RICKETTSIOSE A *RICKETTSIELLA* SP..... 53

1) Pathogénie..... 54
2) Histopathogie..... 54
3) Microscopie électronique..... 56
4) Position systématique..... 60

II - ETUDE DES RICKETTSIOSE A *POROCHLAMYDIA*.... 61

A - Histopathologie et étude en microscopie électronique de la rickettsiose à *Porochlamydia buthi ssp. pisauri*..... 62

1) Histopathologie..... 62
2) Microscopie électronique..... 63
3) Position systématique..... 68

B - Etude histologique et étude en microscopie électronique de la rickettsiose à *Porochlamydia piriformis*..... 69

1) Histopathologie..... 69
2) Microscopie électronique..... 70
3) Position systématique..... 74

(Entre les pages 74 et 75, Planches XIV à XXI Rickettsiose à *Rickettsiella sp* ; Planches XXII à XXVIII Rickettsiose à *P. buthi pisauri* ; Planches XXIX à XXXII Rickettsiose à *P. Piriformis*).

CHAPITRE VII : ETUDES COMPARATIVES DES RICKETTSIES ISOLEES CHEZ *BUTHUS OCCITANUS* AM. ET *PISAURA MIRABILIS* CL. ET DISCUSSIONS RELATIVES A CES MICRO-ORGANISMES..... 75

I - ETUDE COMPAREE PAR CRYODECAPAGE ET TESTS CYTOCHIMIQUES DE *POROCHLAMYDIA BUTHI BUTHI* ET DE LA *RICKETTSIELLA* DE *PISAURA MIRABILIS*..... 75

II - ETUDE DE LA SPECIFICITE D'HOTE DES RICKETTSIES ISOLEES CHEZ *BUTHUS OCCITANUS* AM. ET *PISAURA MIRABILIS* CL. ET DICUSSION SUR CETTE SPECIFICITE ET LA SPECIFICITE CELLULAIRE.... 79

III- ETUDE DES RELATIONS ANTIGENIQUES DES *POROCHLAMYDIA* ET DE LA *RICKETTSIELLA* DE *PISAURA MIRABILIS*..... 83

IV - COMPARAISON DU CYCLE ET DES CARACTERES ULTRASTRUCTURAUX DANS LES GENRES *RICKETTSIELLA*, *POROCHLAMYDIA* ET *CHLAMYDIA*..... 86

V - DISCUSSION SUR LES DIVERS TYPES D'ANOMALIES RENCONTRES AU COURS DU DEVELOPPEMENT DES *RICKETTSIELLA* ET DES *POROCHLAMYDIA* (FORMES ANORMALES ET CORPS GEANTS)..... 90

VI - DISCUSSION SUR LE POUVOIR PATHOGENE DES MICROORGANISMES..... 94

(Entre les pages 97 et 99, Planches XXXIII et XXXIV : tests cytochimiques et cryodécapage)

CHAPITRE VIII : ETUDE DE VIROSES CHEZ LE SCORPION *BUTHUS OCCITANUS* AM. ET CHEZ L'ARAIGNEE *PISAURA MIRABILIS* CL..... 99

I - ETUDE D'UNE VIROSE CYTOPLASMIQUE DE SCORPION *BUTHUS OCCITANUS*..... 99

1) Pathogénie et histopathologie..... 100
2) Structure et morphogenèse du virus..... 101
3) Purification et caractérisation partielle du virus..... 104
4) Discussion..... 104

II - ETUDE DE DEUX VIROSES CHEZ L'ARAIGNEE *PISAURA MIRABILIS*..... 105

1) Pathogénie..... 105

2) Histopathologie..... 106

3) Structure et morphogenèse des virus... 107

III - DISCUSSION..... 111

(Entre les pages 112 et 113, Planches XXXV à XXXIX : Virose de *B. occitanus* ; Planches XL à XLV : Viroses de *P. mirabilis*)

DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS..... 113

BIBLIOGRAPHIE..... 127

INTRODUCTION

L'évolution rapide de la pathologie comparée au cours des dernières années est en partie liée à l'accroissement des recherches pathologiques chez les invertébrés. Le développement de cette contribution est cependant limité du fait de la restriction des études pathologiques et microbiologiques à certains groupes d'arthropodes. Pour des raisons économiques, de nombreux travaux portent en effet sur des maladies d'insectes déprédateurs de cultures et depuis peu sur celles des crustacés qui jouent un rôle dans l'alimentation humaine. Les connaissances sur la pathologie des autres groupes d'invertébrés en particulier les arachnides sont, en revanche, encore très fragmentaires et ne permettent pas d'avoir une idée d'ensemble de la pathologie chez les invertébrés.

Cette constatation nous avait d'abord conduit à étudier la sensibilité des scorpions à des bactéries entomopathogènes très virulentes pour de nombreux insectes. Au cours de cette étude expérimentale (Morel, 1972) nous avions mis en évidence une résistance élevée d'un scorpion à l'ingestion et à l'inoculation des germes ainsi que des réactions de défense de type cellulaire et de type humoral. Ces résultats nous ont incité à poursuivre les études pathologiques sur les arachnides par la recherche de maladies spécifiques.

A partir d'échantillons composés de plusieurs dizaines d'individus nous avons détecté un certain nombre de maladies, principalement d'origine virale et rickettsienne, dans des populations languedociennes de deux arachnides : le scorpion *Buthus occitanus* Am. et l'araignée *Pisaura mirabilis* Cl.

L'isolement de certains des agents infectieux a permis l'étude des affections dont ils sont responsables. L'évolution de chacune des maladies a été suivie chez l'hôte et au niveau cellulaire, et pour chaque agent, une étude morphologique et ultrastructurale a été faite. Dans certains cas elle a été complétée par une étude biochimique.

Dans le premier des chapitres concernant les maladies infectieuses (chapitre IV), nous décrivons une maladie rickettsienne de *Buthus occitanus*, la première signalée chez un scorpion.

L'étude de cette maladie a conduit à la mise en évidence d'un des rares cas d'hyperparasitisme microbien connu chez les parocaryotes intracellulaires. La rickettsie est en effet chez certains scorpions le site de développement d'un virus (phage) et nous avons pu étudier expérimentalement la maladie causée par le complexe rickettsie-phage (chapitre V).

Deux autres chapitres sont consacrés à d'autres maladies infectieuses : le chapitre VI où sont regroupées les études de trois rickettsioses chez l'araignée *Pisaura mirabilis* et le chapitre VIII qui concerne des viroses chez le scorpion et chez l'araignée.

Les divers agents infectieux isolés ont été comparés à ceux déjà connus chez les invertébrés et chez les vertébrés. La plupart d'entre eux présentent des caractères originaux qui seront évoqués, d'une part, au cours d'une étude comparative pour les divers procaryotes (chapitre VII), d'autre part, dans des dicussions en fin de chapitre.

Parmi les microorganismes isolés, trois d'entre eux se différencient de tous les procaryotes décrit jusqu'à présent. Ils constituent dans la classe des Rickettsies un groupe homogène dont la position systématique sera discutée. Seul l'un d'entre eux a été nommé *(Porochlamydia buthi* chez le scorpion *Buthus occitanus)* ; les deux autres plus récemment découverts n'ont fait l'objet que d'une courte publication (Morel, 1978). L'obligation récente de décrire tout nouveau microorganisme, en langue anglaise, dans la revue *"International Journal of Systematic Bacteriology"* et les délais de publication nous conduisent à nommer provisoirement ces deux microorganismes : *Porochlamydia piriformis* et *Porochlamydia buthi sssp. pisauri* ; ces dénominations seront ultérieurement proposées, pour être validées à la revue précédemment nommée.

La mise en évidence de maladies chez ces arachnides, nous permettra d'aborder les problèmes généraux relatifs à la pathologie des invertébrés prédateurs. Celle-ci est en effet très mal connue ; actuellement par exemple, sur plus de 1000 cas de maladies virales signalés chez les insectes (Martignoni et Iwai, 1977), 5 seulement l'ont été chez

des prédateurs. Notre étude apporte donc des éléments d'estimation d'une part, de la sensibilité de certains prédateurs aux maladies de leurs proies d'autre part, de l'importance des maladies infectieuses dans la régulation de leurs populations. Le problème posé par le maintien de maladies dans de telles populations relativement peu denses et au sein desquelles les contacts entre individus sont peu nombreux sera également considéré.

Enfin les microorganismes isolés chez les arachnides vont permettre d'essayer de répondre à certaines questions de microbiologie générale telles celles posées par l'existence de formes géantes et celle de l'évolution des procaryotes intracellulaires.

CHAPITRE I

LES MALADIES INFECTIEUSES DES ARACHNIDES.

La diversité existant chez les arachnides quant à leur mode de vie et leur alimentation a fortement influencé le développement des études pathologiques dans les divers ordres de cette classe d'arthropodes. L'ordre qui a été le plus étudié est celui des acariens et ce en raison du rôle important qu'il joue dans la transmission de maladies virales et rickettsiennes aux vertébrés supérieurs dont l'homme. Les autres ordres ont été négligés jusqu'à ces dernières années ; leur impact économique direct étant inexistant.

I - PATHOLOGIE DES ACARIENS.

Paradoxalement, c'est chez les acariens hématophages que la pathologie est la moins développée. Les médecins et les vétérinaires ont en effet recherché les virus -plus de 50 sont connus en 1970 (Yunker 1970)- et les rickettsies transmises et ne se sont que très peu interessés au développement et à l'action de ces agents infectieux chez l'hôte invertébré. Les quelques données relatives à ces deux points seront rappelées dans le chapitre suivant concernant les rickettsioses et les virus des arthropodes (Chapitre II), mais l'on peut dire que l'action pathogène vis-à-vis de l'acarien vecteur est inexistante ou très faible.

Les seuls parasites intracellulaires strictement inféodés aux acariens hématophages sont actuellement trois microsporidies : *Encephalitozoon ixodis* et *Nosema slovaca* chez *Ixodes ricinus* (Weiser, 1957; Weiser et Rehacek, 1975), *Nosema parkeri* chez *Ornithodoros parkeri* (Krinsky, 1977). Ces microsporidies paraissent peu spécifiques ; *N. slovaca* a été multipliée expérimentalement chez *Dermatocentor reticulatus* (Weiser et Rehacek, 1976) ; et *N. parkeri* chez *Dermatocentor andersoni*, (Krinsky, 1977). Seule *N. slovaca* cause une maladie létale pour son hôte.

De nombreuses mycoses et quelques viroses ont été notées chez des acariens phytophages. Les mycoses les plus fréquemment rencontrées sont dues à des entomophtorales , la mortalité dans les populations d'acariens étant très importante (Nemoto et Aoki, 1975). Les maladies virales également responsables de fortes mortalités sont dues à des virus non inclus, icosaédriques (Smith et coll., 1959) ou bacilliformes (Bird, 1967 ; Reed et Hall, 1972).

II - PATHOLOGIE DES ARACHNIDES NON-ACARIENS.

Les données pathologiques ne concernent actuellement que les trois ordres les plus importants, ceux des aranéides, des scorpions et des opilions. Jusqu'en 1969 on dispose seulement de quelques rapports sur la présence de champignons et de sporozoaires chez ces animaux. Après cette date, une évolution rapide s'annonce avec la mise en évidence de maladies d'origine virale et d'origine rickettsienne dont la plupart font l'objet de notre étude.

1 - Maladies à sporozoaires.

Seules des grégarines ont été décrites et ce uniquement chez les opilions. Connues à la fin du 19ème siècle, leur étude a été reprise récemment par Ormières et Baudoin (1969, 1973). 7 espèces réparties en 4 genres sont reconnues ; elles sont fréquentes dans certaines populations d'opilions où 33 % des individus examinés en sont porteurs. Sans action pathogène sur leur hôte, elles se caractérisent en outre par une absence de spécificité au sein de l'ordre. Les auteurs attribuent ce caractère au mode de vie identique des divers hôtes.

2 - Mycoses.

Signalées chez les araignées, un opilion et un scorpion les maladies d'origine fongique sont causées par des champignons Ascomycètes et Hyphomycètes.

a) Maladies à Ascomycètes (Cordyceps, Torrubiella et Gibellula).

Ce sont les premières maladies signalées chez les araignées et les opilions. Les agents infectieux assez nombreux (Mains, 1950, 1954) ont été étudiés d'un point de vue systématique et leur détermination n'a pas été suivie d'études pathologiques. Cependant la pathogénie de ces champignons doit vraisemblablement être identique à celle des Cordyceps d'insectes mieux connus. Pour ces derniers (McEwen, 1963), la maladie débute par la germination des spores sur les téguments. Capables d'hydrolyser la chitine, les tubes de germination traversent les téguments de l'hôte et pénètrent dans l'hémocoele. Des corps hyphaux apparaissent alors dans l'hémolymphe et s'y multiplient par bourgeonnement remplissant peu à peu l'hémocoele , ce qui entraîne la mort de l'hôte. Les divers tissus sont digérés et remplacés par une masse compacte de mycelium d'où va sortir le stroma qui porte des périthèces renfermant des ascospores. Le développement total de ces champignons nécessite environ 60 jours.

b) Maladies à Hyphomycètes (Aspergillus et Fusarium).

Ces maladies ont été étudiées chez le scorpion *Androctonus australis* (Gysin et Le Corroller, 1969). Les champignons (surtout des *Aspergillus* et des *Fusarium)* sont dans 97 % des cas observés au niveau de blessures superficielles. Des mycoses plus profondes peuvent se développer par extension de foyers localisés à l'origine au niveau des poumons (3 % des cas) ; parfois elles entraînent la mort des animaux. Les champignons isolés, non spécifiques du scorpion, n'hydrolisent pas la chitine. Ils se développent au niveau des blessures et sont incapables dans la plupart des cas de forcer des défenses cellulaires. Ils se comportent donc comme des germes potentiellement pathogènes. L'action létale relevée dans certains cas se produit à la suite de lésions mécaniques très importantes ; ces dernières permettent en effet, au niveau de la blessure, des attaques multiples, bactériennes et fongiques auxquelles les défenses de l'animal ne peuvent faire face.

3 - Rickettsioses.

Les premiers microorganismes de type rickettsien furent signalés chez l'araignée *Coelotes luctuosus* (Osaki, 1973), chez le scorpion *Buthus occitanus* (Morel et Duthoit, 1974) et chez l'araignée *Argyrodes gibbosus* (Meynadier et coll., 1974). Trois autres microorganismes intracellulaires furent ultérieurement trouvés chez l'araignée *Pisaura mirabilis* (Morel, 1977, 1978).

Toutes ces rickettsioses sont causées par des procaryotes intracellulaires qui possèdent un cycle semblable à celui des Chlamydiales. L'action pathogène de ces germes n'a été étudiée que pour quatre d'entre eux, l'agent infectieux ayant pu être isolé. Cette action est variable selon les microorganismes et les hôtes considérés. L'étude de ces quatre rickettsioses fait l'objet de la plus grande partie de notre travail.

4 - Viroses.

Les seuls virus actuellement connus se développent chez le scorpion *Buthus occitanus* (Morel, 1975) et chez l'araignée *Pisaura mirabilis* (Morel et coll., 1977). En dehors de ces deux viroses, il faut signaler l'existence d'une seconde virose chez l'araignée *Pisaura mirabilis*, virose dont l'étude n'a pas encore fait l'objet d'une publication.

CHAPITRE II

LES RICKETTSIOSES ET LES VIROSES CHEZ LES ARTHROPODES.

Les maladies d'origine rickettsiennes et virales constituent deux grands groupes parmi les maladies infectieuses des arthropodes. Elles jouent pour la plupart un rôle dans la régulation des populations sensibles ; mais certaines d'entre elles, interfèrent également avec la pathologie humaine et vétérinaire en raison du rôle des vecteurs de l'hôte invertébré.

Nous allons rappeler rapidement les principales données relatives à ces maladies en insistant sur celles causées par des rickettsies et des virus proches de ceux responsables des affections que nous avons étudiées chez les arachnides.

I - LES RICKETTSIOSES.

Ces maladies sont dues au développement de microorganismes du groupe des rickettsies c'est-à-dire des bactéries Gram-négatif à développpement intracellulaire obligatoire. Nous allons regrouper ces microorganismes selon l'importance de l'action pathogène qu'ils ont sur l'hôte invertébré bien qu'il n'y ait pas concordance totale entre le pouvoir pathogène et leur position systématique. Il arrive en effet, qu'au sein d'un même genre, certaines espèces sont pathogènes et d'autres, apparemment sans action sur l'hôte.

A - Rickettsies non pathogènes ou peu pathogènes pour les arthropodes.

Dans cet ensemble sont regroupées des rickettsies plus ou moins symbiotiques ainsi que des rickettsies pathogènes des vertébrés pour lesquelles l'invertébré constitue un réservoir et un vecteur.

Les rickettsies symbiotiques sont rencontrées dans plusieurs groupes d'insectes, en particulier chez les orthoptères, dictyoptères et coléoptères, ainsi que chez les insectes piqueurs hématophages ou phytophages. Elles se développent souvent dans des sites particuliers (les mycétomes) comme chez de nombreux homoptères et orthoptères. Généralement transmis de générations en générations par passage intraovarien ces microorganismes n'ont que très rarement une action pathogène sur leur hôte (Louis et Laporte, 1969 ; Milburn, 1966). C'est seulement dans des cas de surpopulation qu'une action cytopathogène a pu être notée (Maillet, 1971).

Il faut signaler que parmi les microorganismes décrits par Milburn (1966) chez les blattes, l'un d'entre eux au moins (chez *Byrsotria*) présente les caractères des *Rickettsiella* qui sont chez d'autres insectes et chez les crustacés des microorganismes pathogènes.

Des microorganismes de type rickettsien ont été trouvés dans divers tissus chez des diptères de genre *Glossina* (Pinnock et Hess, 1974) ; ils sont considérés par les auteurs comme des parasites modérés et semblent également pouvoir être transmis à la descendance par voie transovarienne.

Chez d'autres diptères, deux Wolbachia : *Wolbachia pipientis* et *Wolbachia sp.*, sont trouvées dans certaines populations de *Culex pipiens* et *Aedes scutellaris*. Les rickettsies se développent dans le cytoplasme dans la plupart des tissus et sont transmises par voie transovarienne aux nouvelles générations (Yen, 1975). Ils n'ont pas d'action pathogène sur leur hôte mais sont responsables d'une stérilité importante qui a lieu après croisement d'une femelle porteuse ou non des rickettsies avec un mâle porteur du germe (Yen et Barr, 1974).

L'hyménoptère *Dahlbominus fuscipennis* possède également un microorganisme de type rickettsien (Byers et Wilkes, 1970) qui se développe dans les cellules intestinales, génitales et dans des cellules du ganglion abdominal. Il se rapproche, comme les microorganismes précédents, des rickettsies du genre *Wolbachia* et n'a aucune action pathogène sur son hôte.

De nombreuses rickettsies appartenant au genre *Rickettsia*, pathogènes des vertébrés, sont transmises par l'intermédiaire d'un insecte ou d'un arachnide hématophage. Elles se multiplient chez les invertébrés dans les cellules de divers tissus dont celles de l'intestin moyen. Ainsi l'on peut trouver *Rickettsia mooseri* chez la puce *Xenopsylla cheopsis* (Ito et coll., 1975), *R. prowazeki* chez le pou *Pediculus humanus* (Silverman et coll., 1974), et les agents des fièvres boutonneuses chez les acariens *Rhipicephalus sanguineus* (Burgdorfer et coll., 1975) et *Dermatocentor occidentalis* (Cory et coll., 1975). Dans certains cas, chez l'invertébré, un passage trans-ovarien des germes peut assurer la survie de ces derniers sans qu'il y ait nécessité de transmission à l'hôte définitif : le vecteur constitue alors lui-même le réservoir de l'agent pathogène. Une certaine action pathogène a été alors notée chez les tiques ; elles se traduit d'une part par une légère mortalité des femelles adultes fortement infectées, d'autre part par une baisse sensible de la fécondité chez certaines espèces (Burgdorfer et Brinton, 1975).

Les *Rickettsia* et les *Wolbachia* se multiplient comme des bactéries par scissiparité. On n'a jamais pu observer de formes de résistance particulières se traduisant entre autre par des modifications morphologiques ou ultrastructurales des formes végétatives. Cette absence est à mettre en relation avec les processus particuliers des dissémination qui font intervenir soit une transmission transovarienne soit une transmission par inoculation qui évite aux germes de se trouver dans les conditions défavorables que constitue le milieu extérieur et qui nécessitent en général une certaine adaptation (formes de résitance plus ou moins condensées).

B - Rickettsies pathogènes des arthropodes.

Les procaryotes intracellulaires pathogènes signalés chez un certain nombre d'insectes, de crustacés et d'arachnides appartiennent à des genres et à des ordres différents dans la classe des *Rickettsia*. Ils sont assez mal connu en général, et les données relatives à certains d'entre eux ne permettent pas de leur attribuer une position systémati-

que certaine. On trouve parmi ces procaryotes des microorganismes placés dans les genres *Rickettsia, Wolbachia, Rickettsiella* et *Porochlamydia*. Pathogènes, ils se développent surtout dans le cytoplasme des cellules du tissu adipeux *(Rickettsiella* et *Wolbachia)* et du tissu digestif *(Porochlamydia* et *Rickettsia)*. L'envahissement total de ces tissusest souvent mortel.

Parmi les *Rickettsia, R. prowazekii* semble être la seule pathogène pour son hôte invertébré : le pou *Pediculus humanus*. Le microorganisme détruit les cellules intestinales de l'insecte ce qui entraîne la mort de l'hôte (Da Rocha-Lina, 1916 ; Weyer, 1960). Le pou est en effet incapable de régénérer son épithélium intestinal comme le font certains insectes, telle la puce *Xenopsylla cheopsis*, lors d'une attaque rickettsienne.

Les *Wolbachia* sont représentées par deux microorganismes chez les lépidoptères *Samia cynthia X ricini* et *Hyalophora cecropia* (Entwistle et Robertson, 1968). Les cellules de l'intestin moyen de l'hypoderme et du tissu adipeux sont le site de multiplication du germe qui cause la mort des animaux aux stades larvaire ou nymphal. Bien qu'il n'y ait pas de forme de résistance particulière, ces microorganismes conservent leur pouvoir infectieux hors du corps des animaux pendant une longue période (au moins 10 mois).

Les *Rickettsiella* Philip, 1956 sont connues chez des insectes, des crustacés et des arachnides. La systématique du genre est mal établie et pour un certain nombre d'espèces les diagnoses sont inexistantes. Si l'on considère les *Rickettsiella* dont l'appartenance au genre est certaine, les diverses espèces décrites ont été mises en synonymie soit avec une seule espèce : *R. popilliae* par Weiss (1974) soit avec deux espèces *R. popilliae* et *R. grylli* par Croizier (1976).

On compte actuellement près d'une vingtaine de microorganismes ayant été placés dans le genre *Rickettsiella* ; ce sont :

Chez les coléoptères Scarabeidae : *R. popilliæ* (Dutky et Gooden, 1952)
R. melolonthae (Krieg, 1955)
R. cetonidarum (Meynadier et Montsarrat, 1969)

Carabidae : *Rickettsiella sp.* (Sutter et Kirk, 1968 ; Carter et Luff, 1977)

Tenebrionidae : *R. tenebrionis* (Krieg, 1965)

Coccinellidae : *R. stethorae* (Hall et Badgley, 1957)

Chez les orthoptères : *R. grylli* (Vago et Martoja, 1963)
R. schistocercae (Vago et Meynadier, 1965)
R. blattae (Huger, 1964)
(Milburn,1966) décrit un microorganisme non pathogène chez *Byrsotria* dont les caractères ultrastructuraux et le cycle sont ceux des *Rickettsiella*.

Chez les diptères : *R. tipulae* (Müller-Kögler, 1958)
R. chironomi (Weiser et Zizka, 1968)

Chez les lépidoptères : *Rickettsiella sp.* (Kellen et coll., 1972)

Chez les myriapodes diplopodes : *Rickettsiella sp.* (Wilson et Burke, 1972)

Chez les crustacés isopodes : *R. armadilliidi* (Vago et coll., 1970)

amphipodes : *Rickettsiella sp.* (Féderici et coll., 1974)

Chez les arachnides Araneidae : *Rickettsiella sp.* (Meynadier et coll., 1974)

Rickettsiella sp. (Morel, 1977)

Parmi tous ces microorganismes, certains d'entre eux *(R. chironomi* et *R. stethorae)* n'appartiennent pas en fait au genre *Rickettsiella* comme le suggère Götz (1972) et Weiss (1974). D'autres sont uniquemet connus par ce qui serait leur forme de résistance, leur découverte ayant été faite avant le développement des techniques d'études de coupes de tissu en microscopie électronique ; ils ne devraient pas être considérés comme des *Rickettsiella* en l'absence de données relatives à un cycle de multiplication intracellulaire.

Les *Porochlamydia*, qui ont fait l'objet d'une grande partie de notre étude sur la pathologie des arachnides, n'ont pour l'instant été signalées que chez les araignées et les scorpions. Osaki (1973) mentionne le premier un microorganisme de ce type chez l'araignée *Coelotes (= Coras) luctuosus*. Mais trop prudent dans l'interprétation des divers types de particules qu'il observe, il n'établit pas complètement le cycle de développement du microorganisme. Depuis, de tels germes ont été isolés chez le scorpion *Buthus occitanus* (Morel et Duthoit, 1974) et chez l'araignée *Pisaura mirabilis* (Morel, 1978).

Actuellement strictement liés aux arthropodes, les genres *Rickettsiella* et *Porochlamydia* ont en commun un cycle de multiplication intracellulaire au cours duquel ils présentent l'alternance, formes infectieuses - formes de multiplication - formes infectieuses, qui les rapproche des microorganismes du genre *Chlamydia*, genre qui ne regroupe que des microorganismes pathogènes de vertébrés.

Nous allons rappeler les caractères généraux de ces deux genres de microorganismes, seuls représentants de la classe des rickettsies que l'on rencontre chez les arachnides non-acariens. Ces caractères sont bien connus depuis les travaux de Devauchelle et coll. (1972) sur *R. melolonthae*, de Yousfi (1976) et de Louis et coll. (1977) sur *R. armadillidi*.

Ils sont trouvés hors des cellules sous une forme de résistance : la forme infectieuse ou corps élémentaire. D'une taille le plus souvent inférieure à 1 µm , les corps élémentaires constituent le seul type de particule capable de résister en dehors des cellules sans précaution particulière. Cette résistance est probablement liée à la structure de l'ensemble paroi-membrane cytoplasmique qui se forme lors de la maturation des germes.

Les microorganismes se multiplient lorsqu'ils sont intracellulaires. Ils sont alors sous leur forme végétative (corps initial). Les cellules filles de ces corps initiaux se transforment progressivement en de nouveaux corps élémentaires, les stades de transition constituants l'ensemble des corps intermédiaires. Les corps initiaux en se multipliant conduisent à la formation de microcolonies décelables en microscopie optique. Les corps initiaux sont de plus grande taille que les corps élémentaires et leur structure est nettement différente de celle de ces derniers. Les corps intermédiaires vont présenter simultanément des caractères des corps initiaux et des corps élémentaires. En dehors de ces trois groupes de particules existent parfois des particules de grandes tailles : les corps géants. Ces corps plus rares que les précédents renferment des protéines généralement sous forme cristalline ou fibrillaire ; leur rôle et leur signification sont mal connus.

Les rickettsioses causées par les microorganismes du genre *Rickettsiella* évoluent lentement et sont mortelles. Le développement des agents infectieux se fait généralement dans les tissus adipeux mais la spécificité cellulaire, de même que la spécificité d'hôte de ces agents est relativement faible.

II - LES VIROSES.

Les virus des arthropodes sont, de même que nous l'avons signalé pour les rickettsies, soit strictement inféodés à leur hôte invertébré, soit pathogènes aux vertébrés ou aux plantes et transmis par des arthropodes vecteurs. Dans ce cas, ils sont regroupés sous l'appelation générale d'Arbovirus (Arthropod-born-virus).

Les Arbovirus comprennent un grand nombre de virus appartenant à différentes familles : Poxviridae, Rhabdoviridae, Togaviridae, Picornaviridae etc, qui sont principalement transmis par des insectes (moustiques, phlébotomes) et par des arachnides (acariens) hématophages (Fenner, 1968 ; Yunker, 1970 ; Wagner, 1974, Pfefferkorn et Shapiro, 1974). Si certains d'entre eux sont simplement véhiculés par le vecteur, pour la plupart ils s'y multiplient sans avoir d'action pathogène. La multiplication alternée chez le vertébré et l'invertébré est généralement obligatoire bien que l'on connaisse des cas de transmission transovarienne chez le vecteur. L'infection de cellules cultivées *in vitro* a permis de constater leur forte action cytopathogène sur les cellules de vertébrés et leur faible action sur les cellules d'arthropodes. Ceci est à mettre en relation avec la différence d'action pathogène notée *in vivo*

Beaucoup plus nombreux sont les virus strictement liés aux arthropodes. La multiplication a lieu pour la plupart d'entre eux au cours des stades larvaires de l'hôte. Un millier de virus environ sont connus, dont 98 % ont été signalés chez des insectes. Deux familles, celle des Reoviridae et celle des Baculoviridae renferment les virus responsables de 75 % de ces maladies. Nous allons rappeler brièvement les principales caractéristiques de ces deux types de viroses, un virus de chacune de ces familles ayant été isolé au cours de notre étude chez les arachnides.

Les Reoviridae.

Cette famille, qui comprend des virus pathogènes pour l'homme (*Reovirus* et *Rotavirus*), d'autres vertébrés (*Rotavirus* et *Orbivirus*) et des plantes, est principalement représentée chez les arthropodes par les

virus des polyédroses cytoplasmiques (Fenner, 1976). Comme tous les Reoviridae, les virus des polyédroses cytoplasmiques (CPV : cytoplasmic polyedrosis virus) sont des virus de symétrie cubique, nus, à ARN bicatenaire segmenté et dont la morphogenèse est intractytoplasmique. Leur diamètre est d'environ 70 nm et ils possèdent une double capside caractéristique de la famille formée de deux couches concentriques de capsomètres. Ils portent aux sommets de l'icosaèdre des projections tronc-coniques caractéristiques (Aizawa, 1971 ; Payne et Harrap, 1977)

La morphogenèse a lieu dans de petits stromas virogènes disséminés dans l'ensemble du cytoplasme ; des éléments de petite taille et de forte opacité aux électrons correspondent à la zone centrale des particules (cores) apparaissent à la périphérie de ces stromas et les virus complets s'assemblent au moment de leur incorporation dans les polyèdres (Arnott et coll., 1968).

Les Baculoviridae.

Les Baculovirus ont été jusqu'à présent uniquement trouvés chez des arthropodes : insectes, crustacés, arachnides. Ils causent des maladies connues sous le nom de polyédroses nucléaires et de granuloses. Ce sont des virus de symétrie hélicoïdale, enveloppés et à ADN bicatenaire superhélicoïdal (Fenner, 1976). Leur développement a lieu totalement (Polyédroses nucléaires) ou débute au moins dans le noyau avant de se terminer dans le cytoplasme (Granulose). Dans la majorité des cas, les particules virales sont incluses individuellement (granuloses) ou collectivement (Polyédroses nucléaires) dans des corps d'inclusion de nature protéinique mais elles peuvent être libres.

En forme de bâtonnet, le virion est constitué d'une enveloppe de type membrane unitaire qui renferme une nucléocapside rigide allongée. La taille des virions varie selon les espèces de 200 à 400 nm de long sur 40 à 110 nm de large celle de la nucléocapside de 180 à 340 nm de long sur 30 à 80 nm de diamètre. Cette dernière est généralement droite mais peut présenter une courbure plus ou moins importante (Scharnhorst et coll., 1977 ; Pappalardo et Bonami, 1979).

La morphogenèse est différente dans le cas des granuloses de celle observée dans les polyédroses. Alors que dans les polyédroses nucléaires, la morphogenèse reste localisée au nucléoplasme, la localisation cytoplasmique de certaines phases de la morphogenèse virale, conséquence de la rupture précoce de la membrane nucléaire, est caractéristique des granuloses. L'hypertrophie nucléaire qui marque le début de l'infection est suivie de l'apparition dans la région centrale d'une masse dense aux électrons qui constituent le stroma virogène (Arnott et Smith, 1968 ; Summers et Arnott, 1969 ; Harrap, 1972 ; Hirumi et coll., 1975). Les capsides nues apparaissent ensuite au contact de ce stroma et s'emplissent de matériel nucléoprotéinique. Des structure membranaires se forment dans le noyau et s'associent avec les nucléocapsides précédemment formées. L'acquisition de l'enveloppe suit cette association. Au cours de ce processus les nucléocapsides sont enveloppées, soit individuellement, soit en faisceaux. Les virions ainsi formés s'incluent généralement dans un réseau cristallin protéinique qui constitue les polyèdres.

A partir de ce schéma général de la morphogenèse virale, des variations peuvent intervenir dans les processus conduisant à l'acquisition de l'enveloppe et la formation ou non des corps d'inclusion.

L'enveloppement peut en effet faire suite à un bourgeonnement de la nucléocapside au niveau de la membrane nucléaire ou au niveau de la membrane cytoplasmique. Les nucléocapsides nues dans ce dernier cas rejoignnant le cytoplasme en passant par les pores nucléaires (Kawamato, et coll., 1977 a,b ; Adams et coll., 1977).

Certains Baculovirus semblent ne pas posséder le gène de synthèse de la protéine d'inclusion car leur développement ne s'accompagne jamais de la formation de polyèdres. Ils sont provisoirement rangés dans la sous-groupe C des Baculovirus défini par le Sous Comité de nomenclature des virus d'invertébrés (Fenner, 1976). On trouve ces virus chez des arachnides acariens (Bird, 1967 ; Reed et Hall, 1972) des crustacés (Bazin et coll., 1974 ; Johnson, 1978 ; Pappalardo et Bonami, 1979) des insectes coléoptères (Huger, 1966 ; Gouranton, 1972 ; Monsarrat, 1978) des diptères (Jaenson, 1978) et des hyménoptères (Avery et coll., 1977)

CHAPITRE III

MATERIEL ET METHODES

I - LES ARACHNIDES ETUDIES.

A - Biologie et élevage des arachnides.

1 - *Pisaura mirabilis* Clerck (Araneidae, Pisauridae).

Cette araignée (Pl. I, Fig. 1) très commune en France mène une vie errante dans la strate herbacée. Sa durée de vie est de 14 à 15 mois et un chevauchement de générations existe du fait de la survie de la femelle à la ponte. Dans la région de Montpellier, la ponte a lieu de la fin mai à la fin juin. La femelle garde dans une toile pouponnière les oeufs puis les jeunes jusqu'à sa mort qui se produit au cours des mois de juillet et août. A partir de la fin du mois de septembre, on rencontre des jeunes qui sont alors aux stades 5 ou 6 ; ils devront encore muer 5 à 6 fois pour atteindre le stade adulte (stade 10 pour les mâles et stade 11 pour les femelles). La détermination des stades peut être faite en utilisant un barème trichobothriotaxique (Emerit et Bonaric, 1975 ; Bonaric, 1975). Dans la station la plus prospectée, on peut estimer au moins à 4 individus par m^2 le densité de population au mois de septembre (nymphes aux stades 5 et 6).

Les araignées sont élevées individuellement dans des tubes en verre à une température variant de 20 à 22°C. Elles sont nourries 3 fois par semaine avec des drosophiles ou de jeunes grillons. Un morceau de coton imbibé d'eau leur permet de boire à volonté. Dans de telles contions, les araignées se développent normalement, muent régulièrement tous les 12 à 30 jours selon les stades (Bonaric, 1974) et atteignent le stade adulte. En laboratoire, les adultes sont obtenus plus tôt que dans la nature, les animaux libres ayant une activité hivernale beaucoup plus réduite et des durées d'intermue plus longues qu'en laboratoire durant cette période.

2 - *Buthus occitanus* Amoreux (Scorpion, Buthidae).

Le scorpion *Buthus occitanus occitanus* (Pl. I, Fig. 2) vit en France dans la région méditerranéenne. On peut le capturer dans la garrigue aux alentours de Montpellier dans quelques stations localisées. Il passe la journée dans un terrier peu profond creusé sous une pierre et ne sort que la nuit pour se nourrir. D'assez grande taille (jusqu'à 9 cm), il vit plusieurs années. Les jeunes naissent en juillet et en août ; ils restent en compagnie de la mère durant le premier et une partie du deuxième stade larvaire. Les animaux sont adultes au stade 7 et il semble y avoir 1 à 2 mues par an. Si les mâles meurent après l'accouplement, les femelles elles, peuvent avoir plusieurs parturitions. Le développement complet a pu être obtenu en laboratoire en moins d'un an (Auber, 1963) mais il semble, d'après nos observations sur le terrain, qu'il prend au moins 2 ans dans les conditions naturelles. Les 5 derniers stades se rencontrent en toutes saisons.

Le nombre de jeunes à la parturition est souvent supérieur à 40 ; il décroît très rapidement dès que les jeunes ont quittés leur mère ; sans doute du fait de la prédation intraspécifique mais également de celle exercée par les araignées et les scolopendres vivant dans les mêmes biotopes. En l'absence de données précises, on peut estimer par défaut d'après le nombre d'individus capturés dans les stations, la densité de population à environ 1 individu pour 10 m^2 dans les environs de Montpellier.

Au laboratoire, les scorpions sont élevés individuellement dans des boîtes rectangulaires. Ils peuvent se passer de boisson s'ils sont suffisamment nourris. La nourriture est à base de grillons *Acheta domestica* et de larves du coléoptère *Tenebrio molitor*. Maintenus à 28°C, ils peuvent vivre plusieurs années. Une mortalité importante existe cependant au moment de la mue, la sécheresse régnant dans les élevages entraînant souvent la dessication de l'animal juste après l'exuviation.

3 - Autres arachnides.

Plusieurs espèces de scorpions et l'araignée *Micrommata virescens* Clerk ont été utilisées lors de l'étude de la spécificité d'hôte des microorganismes isolés. Les techniques d'élevage sont identiques à celles précédemment décrites sauf pour certains scorpions américains pour lesquels l'atmosphère des boîtes d'élevage a été humidifiée à l'aide d'un coton imbibé d'eau. Déterminés par les expéditeurs ou en utilisant les clés de détermination établies par Vachon (1952), les scorpions proviennent :

d'Amérique du nord : *Rhopalurus laticauda* (Buthidae)
Paruroctonus aquilonalis (Buthidae),

d'Amérique du sud : *Diplocentrus spitzeri* (Diplocentridae)
Tityus clathratus (Buthidae)
Tityus discrepans (Buthidae).

d'Afrique du nord : *Scorpio maurus* (Scorpionidae)
Androctonus amoreuxi (Buthidae)
Androctonus australis (Buthidae)
Buthacus leptochelys (Buthidae)
Cicileus exilis (Buthidae)
Buthus occitanus s.sp. mardochei (Buthidae)
Buthus occitanus s.sp. tunetanus (Buthidae)

de France : *Euscorpius flavicaudis* (Chactidae).

B - Données histologiques sur *Buthus occitanus* et *Pisaura mirabilis*.

En raison des études histopathologiques qui ont été faites au cours de l'étude de chacune des maladies du scorpion *Buthus occitanus* et de l'araignée *Pisaura mirabilis*, nous allons rappeler brièvement les caractères des principaux tissus où se développent les agents microbiens. L'interprétation des coupes observées a été faite d'après les données de Millot (1926) sur l'histophysiologie des Araneides.

L'organe le plus important pour notre étude est l'intestin diverticulaire ; c'est également le tissu le plus important quantitativement tant chez le scorpion que chez l'araignée (Pl. II, Fig. 3). Nous rappelerons plus rapidement la structure d'un autre tissu, le tissu interstitiel.

1 - Intestin diverticulaire.

Egalement appelé hépatopancréas, l'intestin diverticulaire constitue l'une des parties de l'intestin moyen. Il est formé de diverticules ramifiés qui proviennent du tube axial de l'intestin. Présent dans le céphalothorax ainsi que dans l'abdomen, il est surtout développé dans ce dernier. Les fonctions digestives ont principalement lieu dans les diverticules (Pl. II, Fig. 3-4) l'épithélium de ces derniers est composé de deux principales catégories de cellules : les cellules absorbantes et les cellules à ferments (Pl. III, Fig. 6-7).

a) Les cellules absorbantes.

Ces cellules de grande taille (100 µm de long) sont allongées ou pyramidales chez le scorpion (Pl. III, Fig. 6), en forme de massue chez l'araignée (Pl. III, Fig. 7). Elles renferment au sein d'un cytoplasme peu colorable de très nombreuses enclaves de 4 à 10 µm constituées de produits de réserve ainsi que des substances de déchet surtout dans leur région apicale. Les noyaux sont sphériques de 5 à 6 µm de diamètre ; la chromatine est régulièrement disposée sous forme de granules à la périphérie de ces noyaux. Chez l'araignée, certaines cellules sont binuclées, l'un des noyaux occupe une position normale médiane ou basale, l'autre est en position apicale. Ce dernier sera expulsé avec les produits de déchet à la suite de la décapitation de la cellule.

b) Les cellules à ferment.

Moins nombreuses et moins hautes que les cellules absorbantes, les cellules à ferment se caractérisent par un cytoplasme fortement basophile. Elles renferment des sphérules acidophiles de 5 à 8 µm de diamètre ; le noyau atteint de 10 µm de diamètre (Pl. III, Fig. 6-7).

Outre ces deux types de cellules on rencontre chez *Pisaura mirabilis* de petites cellules basales au contact du tissu interstitiel ces cellules au cytoplasme très clair sont à l'origine du renouvellement des cellules absorbantes. De telles cellules n'ont pas été observées chez *B. occitanus*.

2 - Le tissu interstitiel.

Le tissu interstitiel est surtout développé dans l'abdomen des deux arachnides ; il s'y localise entre les diverticules intestinaux. Les travées formées sont peu épaisses, généralement composées de deux couches de cellules (Pl. II, Fig. 3-4 ; Pl. III, Fig. 5). Dans ce tissu sont visibles les tubes de Malpighi et des vaisseaux sanguins. Les cellules sont généralement de petite taille, (40 µm de long sur 10 de large). Grossièrement polyèdrique leur cytoplasme est légèrement basophile, il renferme de nombreuses inclusions de nature lipidique. Le noyau, petit (5 µm), occupe une position centrale ; il apparaît souvent étoilé en raison du nombre important des inclusions lipidiques.

II - RECHERCHE, ISOLEMENT ET PURIFICATION DES AGENTS INFECTIEUX.

A - Recherche et isolement.

Les agents infectieux sont recherchés à partir d'échantillons de plusieurs dizaines d'individus prélevés dans diverses stations et maintenus en élevage. Le processus conduisant à l'isolement des germes débute lors de la mort d'un animal ou lors de l'apparition d'un comportement anormal :

Etape 1 -fixation d'une partie des tissus
-confection de frottis d'hémolymphe
} Coloration ⟶ 2
-conservation du reste de l'animal au congélateur.

Etape 2, Examen des coupes et des frottis.
-tissus apparemment normaux ⟶ matériel éliminé.
-présence de microorganismes (bactéries ou champignons) ⟶ 3

-observation de plages cytoplasmiques feulgen positif ——→ 4
-observation de noyaux anormaux (noyaux denses ou hypertrophiés) ou de lesions tissulaires sans altérations nucléaires ni plages feulgen positif. ——→ 4

Etape 3, Mise en culture sur gélose nutritive ou milieu de Sabouraud, isolement des différentes souches. ——→ 6

Etape 4, Examen au microscope électronique du broyat brut d'une partie des tissus conservés.
-présence de particules d'allure virale ou d'allure rickettsienne ——→ 5
-absence de particules d'allure virale ou d'allure rickettsienne matériel éliminé.

Etape 5, Clarification des broyats (1000g durant 10 nm) et concentration du surnageant (10000g durant 20 ' ou 23000g durant une heure selon la taille des particules) et observation des culots en microscopie électronique.
-particules observées lors de l'étape 4 plus nombreuses. ——→ 6
-absence des particules suspectes observées en 4. matériel éliminé.

Etape 6, Infection par voie buccale et infection par inoculation d'animaux apparemment sains à partir du matériel obtenu en 3 ou en 5.
-multiplication des microorganismes ou réobtention des particules suspectes accompagnée ou non de mortalité. Reproduction des lésions tissulaires. Etude de la maladie.
-absence de multiplication, lésions tissulaires ou non reproduites. matériel éliminé.

Ce processus n'a pas pour l'instant permis d'obtenir des bactéries ou des champignons pathogènes pour les arachnides.

Il a été complété ultérieurement, à la suite de la découverte d'agents infectieux dont le développement n'entraîne pas de troubles visibles chez l'hôte, par une étude systématique des déjections. Les déjections de 10 individus sont regroupées, leur étude débute à l'étape 4 du processus. Elle permet dans certains lots l'observation de particules d'allure rickettsienne ou virale ; cette observation est suivie de la recherche parmi les 10 animaux d'origine du ou des porteurs de germes qui seront séparés des individus sains.

B - Purification.

Les agents infectieux isolés sont multipliés grâce aux infections expérimentales. Leur purification est rendue nécessaire pour certaines études comme la détermination de l'acide nucléique des virus ou pour l'obtention d'immunsérum. Les virus et les rickettsies sont obtenus par broyage des tissus et des déjections dans un tampon Tris-HCL ou un tampon phosphate de Ph 7,2. Les broyats sont clarifiés par centrifugation à basse vitesse (1000 g durant 20 mn). Les rickettsies sont ensuite concentrées par centrifugation à 10000 g durant 20 mn, les virus par centrifugation à 23000g durant une heure. Les culots repris dans le tampon initial sont centrifugés en gradient de densité de saccharose (20/50 poids/poids) et centrifugé à 72000 g durant 20 mn. Les bandes obtenues sont récupérées diluées dans le tampon et centrifugées à 10000 ou 23000 g pour éliminer le saccharose. La pureté du matériel concentré est ensuite contrôlée au microscope électronique, plusieurs cycles de centrifugation sont parfois nécessaires pour l'obtention de matériel pur.

III - TECHNIQUES D'INFECTIONS.

Expérimentalement les scorpions et les araignées ont principalement été contaminés à la suite de l'ingestion de matériel infectant. D'une part, ce mode de contamination "per os" est vraisemblablement celui qui est responsable de la transmission des maladies chez les animaux libres et, d'autre part le site de multiplication des germes isolés est restreint, sauf exception, aux cellules du tissu digestif.

Pour la contamination "per os" des scorpions, le matériel infectant est inoculé à des grillons de l'espèce *Acheta domestica*, le contrôle de la prise de nourriture étant effectué 24 heures après présentation de la proie. L'infection par inoculation est faite par injection dans l'hémolymphe au niveau du 3ème tergite abdominal.

Les araignées ont été contaminées par l'intermédiaire de l'eau de boisson. Afin de contrôler la prise du matériel infectant, chaque animal a été individuellement abreuvé après trois jours de privation de nourriture et de boisson. Les suspensions infectantes sont présentées à chaque animal à l'aide d'une pipette pasteur. L'inoculation des araignées à parfois été réalisée ; elle est même nécessaire pour l'obtention de la transmission d'une des maladies à un taux suffisamment élevé. Les araignées sont alors endormies par le gaz carbonique et le matériel infectantest inoculé dansle fémur ou au niveau d'unehanche après autonomie de la patte correspondante. La mortalité post-opératoire est très importante et peut atteindre 30 % après 24 heures.

IV - TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES.

Les comparaisons des divers microorganismes responsables de maladies chez l'araignée et le scorpion ont nécessité l'obtention d'immunsérums spécifiques. Les antigènes sont constitués par des suspensions des formes de résistance (corps élémentaires) des microorganismes isolés. Contrôlées pour leur pureté en microscopie électronique, ces suspensions proviennent de matériel purifié en gradient de densité de sucrose.

Les immunsérums utilisés sont des immunsérums de lapins. Les lapins reçoivent par voie sous-cutanée, au niveau de la paroi abdominale, des doses de 0,25 à 0,5 ml de suspension antigénique. La première inoculation comprend en outre la même quantité d'adjuvant complet de Freund. Des rappels avec les mêmes quantités de matériel antigénique sont faits toutes les semaines durant les trois semaines suivantes ou au bout d'un mois ; le sang des lapins est prélevé 5 à 10 jours après

le dernier rappel, il est ensuite centrifugé après coagulation ; seul le sérum est conservé.

Les techniques sérologiques utilisées sont d'une part l'agglutination sur lame selon Giroud (1943) et d'autre part l'agglutination en tube selon Luoto (1953).

Outre les antigènes et les immunsérums correspondants des microorganismes que nous avons isolés, nous avons utilisé lors des comparaisons immunologiques diverses souches de microorganismes ainsi que leurs immunsérums :

- *Proteus vulgaris*
- *Rickettsia mooseri, R. conorii, Coxiella burneti, Neorickettsia*
- *Chlamydia psittaci*
- *Rickettsiella melonlonthae, R. tipulae, R. cetonidarum, R. grylli.*

V - TECHNIQUES HISTOLOGIQUES.

Les divers tissus,ou les animaux in toto, sont fixés au Helly ou au Carnoy. Les pièces sont directement incluses à la paraffine ou subissent une double inclusion à la celloïdine-paraffine lorsque la cuticule est présente. Les coupes réalisées ont 5 à 7 µm d'épaisseur.

Les techniques des colorations effectuées peuvent être trouvées dans les traités de Langeron (1949), Martoja et Martoja-Pierson (1967), Humason (1962) et Gabe (1968).

La coloration de Mann-Dominici est systématiquement effectuée. La coloration des microorganismes est excellente de même que celle des divers tissus. Selon les nécessités, elle est complétée par d'autres colorations polychromes : Trichrome de Ramon y Cajal, Azan de Heidenhain et par des colorations plus spécifiques.

Pour les microorganismes : coloration de Giemsa sur coupe, coloration de Gram selon Weigert et selon Glynn, coloration de Castañeda et coloration par la thionine picriquée. Pour la mise en évidence des acides nucléiques : réaction de Feulgen et Rossenbeck, coloration par la laque chromique de gallocyanine et coloration de Unna-Pappenheim. La tétrazoréaction de Danielli a été utilisée pour la recherche de protéines dans certaines structures et la coloration à l'acide périodique-schiff pour celle du glycogène et des substances APS positives.

VI - MICROSCOPIE ELECTRONIQUE.

Les suspensions à étudier sont déposées sur des grilles collodionnées et carbonées et colorées négativement par une solution neutre de phosphotungstate de sodium.

L'étude des coupes fines en microscopie électronique est principalement faite sur des sections de matériel fixé par le glutaraldéhyde à 3 % dans un tampon cacodylate de sodium 0,1 M de pH 7,2 et post-fixé après lavage par de l'acide osmique à 2 %. Les pièces déshydratées dans des bains d'acétone de concentration croissante sont incluses selon la technique de Spurr (1969) après passage dans l'oxyde de propylène. Les coupes fines sont colorées à l'acétate d'uranyle et au citrate plomb, les coupes semi-fines par le bleu de toluidine boraté.

L'étude des acides nucléiques sur coupe est faite, d'une part par l'extraction préférentielle de l'ADN par fixation au permanganate de potassium (1 %, 30 mn) selon la méthode de Yotsuyanagi (1960), d'autre part par coloration régressive à l'EDTA (Bernhard, 1968). Cette coloration régressive fait suite à une simple fixation au glutaraldéhyde et à l'inclusion des pièces dans l'épon ou le mélange de Spurr ; les coupes sont traitées à l'EDTA durant 15 à 60 mn.

Des essais de digestions de certaines structures par une protéase ont été réalisés en utilisant la pronase selon la méthode de Monneron et Bernhard (1966).

Les études par cryodécapage sont faites à partir de matériel fixé 30 minutes (glutaraldéhyde 2,5 % dans un tampon cacodylate 0,1 M), rincé une heure dans le même tampon et imprégné de glycérol à 20 % (20 à 30 mn). Les pièces montées sur des porte-objets en or sont congelées quelques secondes dans le fréon 22 puis dans de l'azote liquide. Les cryofractures sont effectuées dans un appareil Cryofract selon Escaig et Nicolas (1976) ou dans un appareil Balzer B.A.F. 300 selon la méthode de Moor et Muehlethaler (1963). Les répliques sont nettoyées à l'acide chromique puis à l'eau de javel avant d'être examinées.

VII - TECHNIQUES BIOCHIMIQUES.

La détermination de l'acide nucléique de certain virus a été obtenue par dosage de l'ADN par la réaction à la di-phénylamine selon la méthode de Dische (1930) modifiée par Giles et Myers (1965) et par dosage de l'ARN par la méthode à l'orcinol selon Mejbaum (1939).

Le dosage des protéines virales a été effectué par utilisation du réactif de Folin selon la méthode de Hartree (1972) et comparaison avec une gamme étalon témoin de seroalbumine bovine.

PLANCHE I

Fig. 1. : Mâle sub-adulte de *Pisaura mirabilis* Cl. (Stade 9). X 2,8.

Fig. 2. : Jeune *Buthus occitanus* Am. (stade 4). X 2,8.

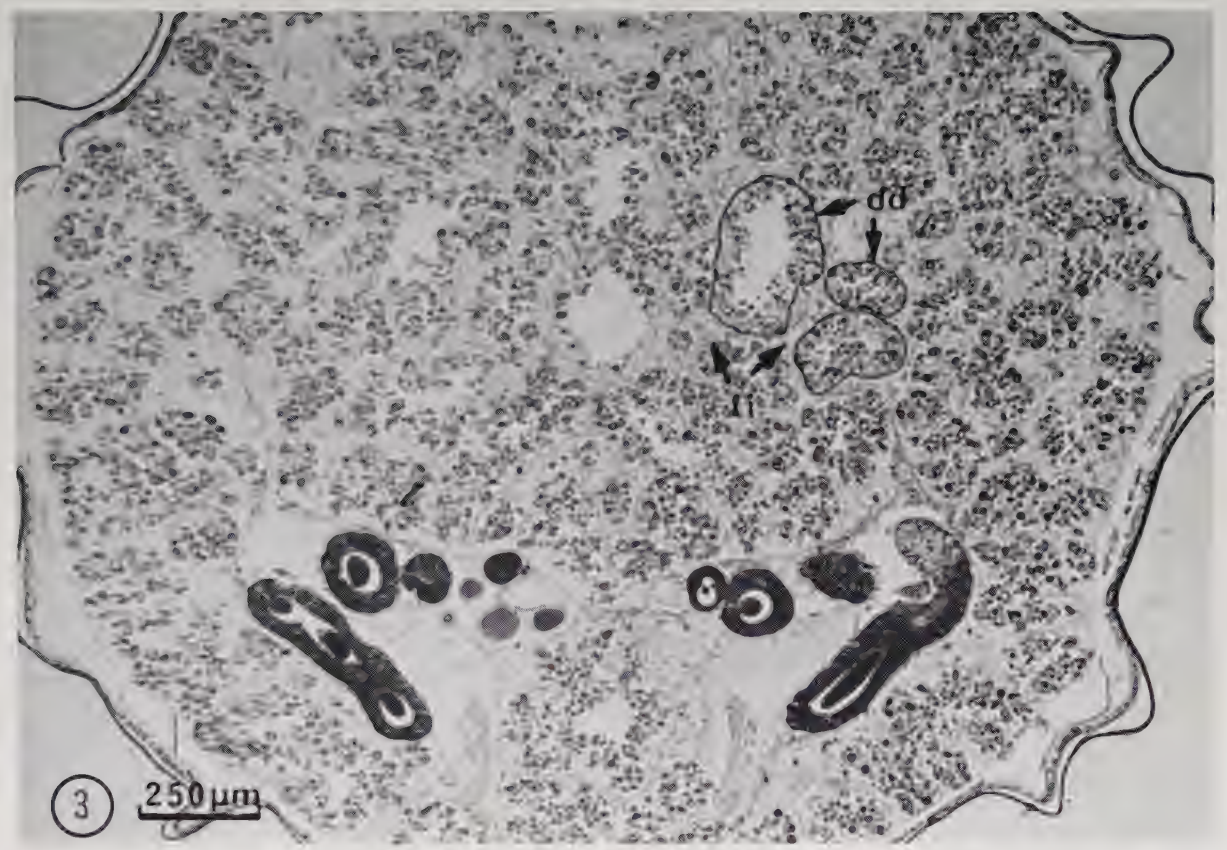
1
1 cm

2
1 cm

PLANCHE II

Fig. 3. : Section transversale de l'abdomen de *Pisaura mirabilis*. On remarque l'importance de l'hépatopancréas dont les diverticules digestifs (dd) sont séparés par des travées de tissu interstitiel (ti). Coloration de Mann-Dominici. X 64.

Fig. 4. : Portion d'hépatopancréas de *Buthus occitanus* montrant l'importance relative des diverticules digestifs (dd) et du tissu interstitiel (ti). Coloration de Mann-Dominici. X 140.


dd
ll
3
250µm

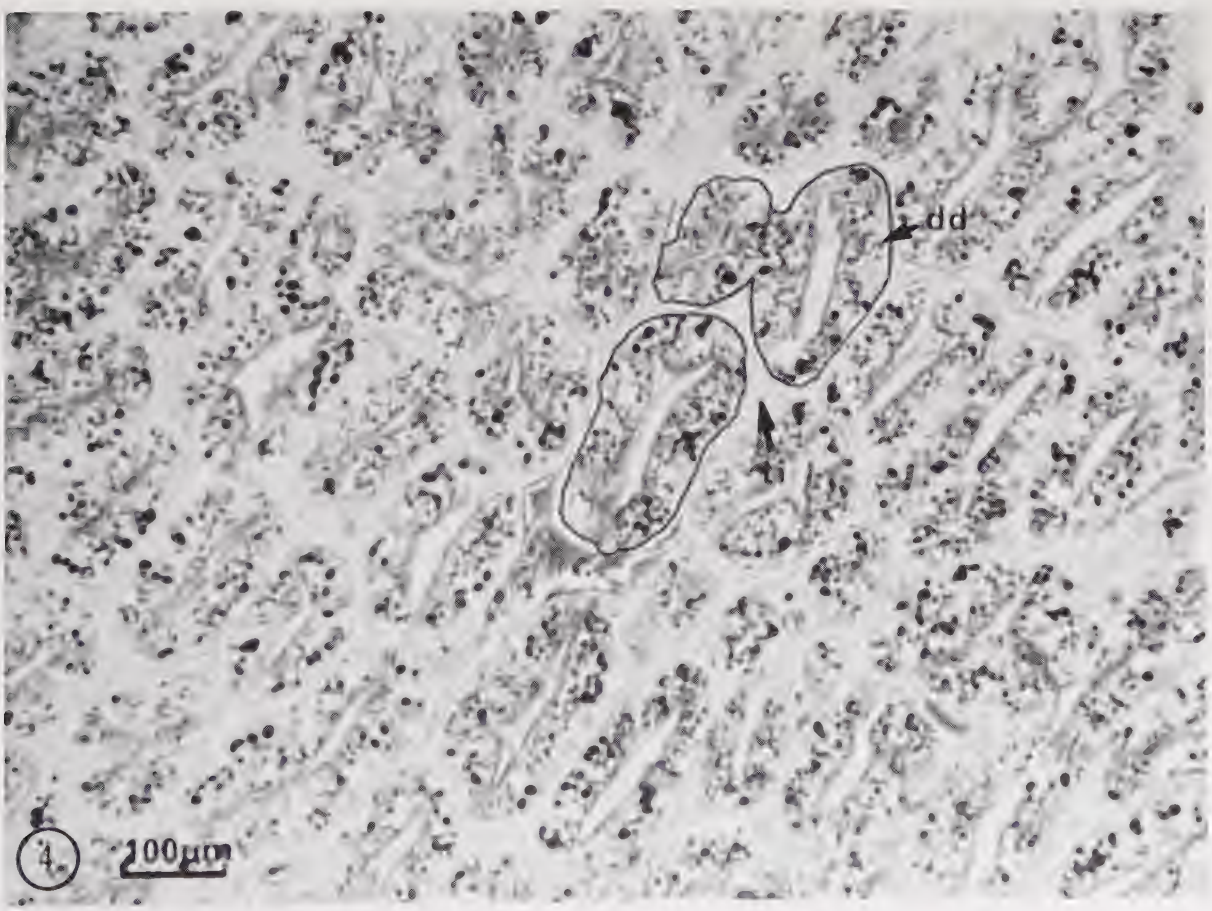
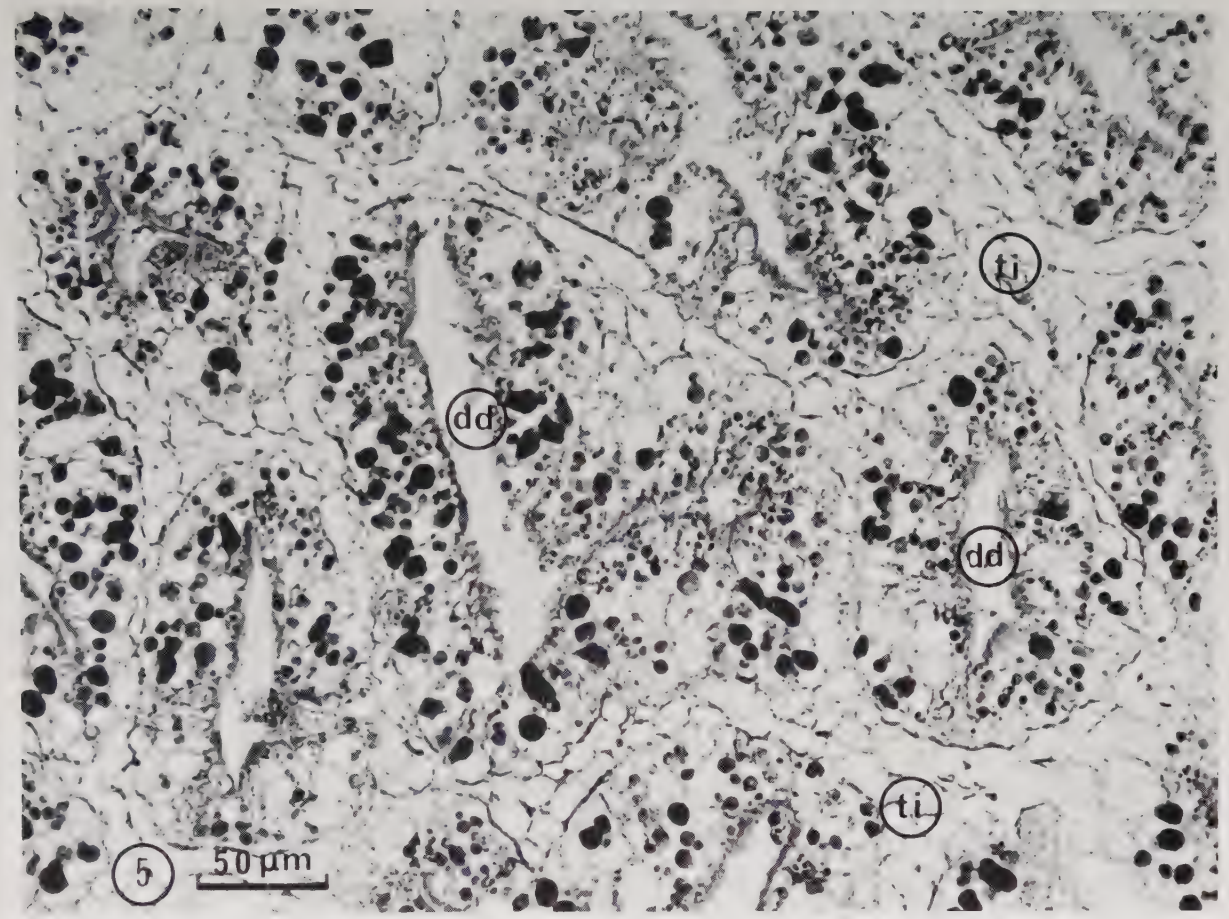

dd
ll
4
100µm

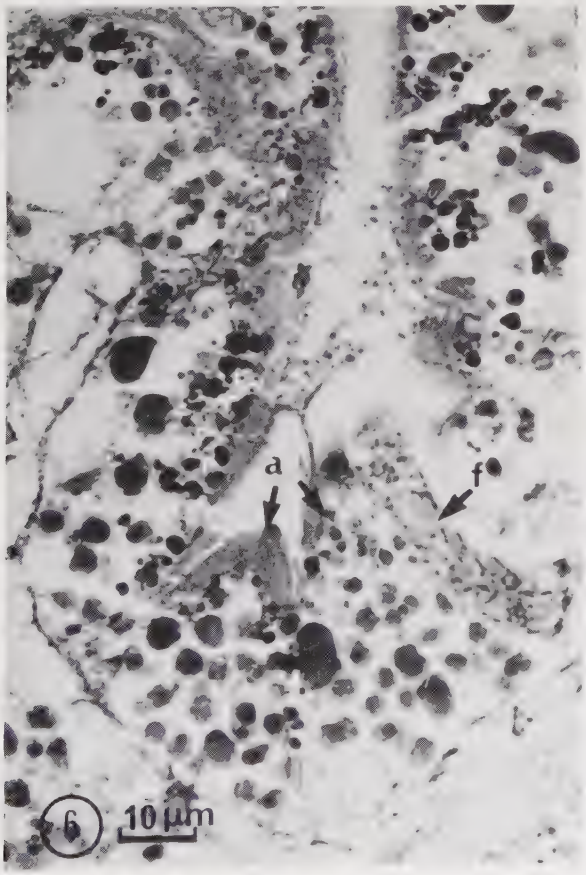
PLANCHE III

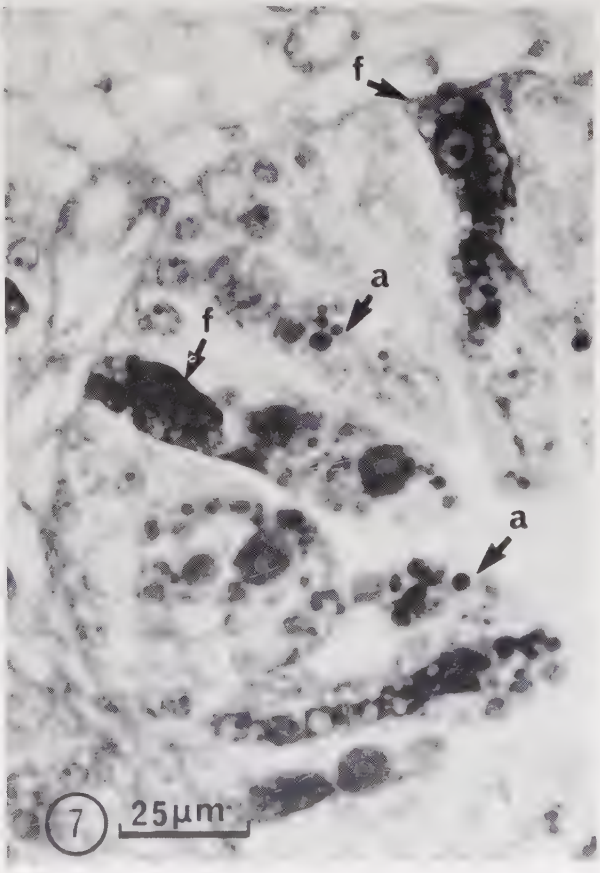
Fig. 5. : Hépatopancréas du scorpion. L'épithélium des diverticules digestifs (dd) est formé d'une seule couche de cellules. Les travées du tissu interstitiel (ti) comprennent généralement deux couches de cellules. Coloration de Mann-Dominici. X 350.

Fig. 6. : Détail d'un diverticule digestif de *Buthus occitanus*. a : cellule absorbante, f : cellule à ferment. Coloration de Mann-Dominici. X 1000.

Fig. 7. : Détail d'un diverticule digestif de *Pisaura mirabilis*. a : cellule absorbante, f : cellule à ferment. Coloration de Mann-Dominici. X 700.


ti
dd
dd
ti
5
50 µm


a
f
6
10 µm


f
a
f
a
7
25 µm

CHAPITRE IV

ETUDE D'UNE RICKETTSIOSE CAUSEE PAR *POROCHLAMYDIA BUTHI* CHEZ LE SCORPION *BUTHUS OCCITANUS* AM.

A la suite de la mort au cours d'élevage, de scorpions capturés dans la région montpelliéraine, nous avons procédé à des examens histologiques qui ont permis de détecter des anomalies dans les cellules sanguines et dans les cellules digestives de ces animaux. Sur frottis d'hémolymphe, d'importantes vacuoles dans les plasmatocytes suggèrent une action phagocytaire des cellules bien qu'aucun matériel colorable y soit visible. Les coupes histologiques révèlent par ailleurs l'existence de plages basophiles et finement granulaires dans les cellules de l'hépatopancréas. En l'absence d'éléments reconnaissables tels des champignons ou des bactéries, et en raison du caractère Feulgen-positif de ces plages qui traduit leur richesse en acide nucléique, la recherche d'un agent infectieux de plus petite taille a alors été entreprise par l'examen au microscope électronique des broyats des animaux présentant ces anomalies. On a ainsi pu détecter dans ces broyats la présence de particules ovoïdes mesurant environ 0,5 µm de long et rappelant les formes de résistance des *Rickettsiella* d'insectes. Nous sommes parvenus à reproduire les symptômes histopathologiques de la maladie en faisant ingérer à des animaux sains les broyats filtrés à 0,45 µm et renfermant les particules ovoïdes. Simultanément, ces filtrats ont été utilisés pour ensemencer des milieux bactériologiques où aucun développement bactérien ou fongique n'ont pu être notés.

La maladie apparaissait donc comme infectieuse, causée par un agent filtrable, non cultivable sur milieu artificiel et se multipliant dans le cytoplasme des cellules digestives. L'hypothèse d'une origine rickettsienne de la maladie émise à la suite de ces observations a pu être confirmée grâce à l'étude de coupes fines, en microscopie électronique, des scorpions infectés expérimentalement (Morel et Duthoit, 1974). Nous parlerons donc dès à présent d'un microorganisme de type rickettsien bien que son appartenance à ce groupe de procaryote ne sera établie qu'au cours des études ultrastructurales.

Le pourcentage de scorpions atteint par cette rickettsiose dans les populations au nord de Montpellier varie entre 5 et 10 % selon les stations prospectées et selon la période de capture ; ce taux élevé traduit à notre avis l'état endémique de cette maladie.

1 - Pathogénie.

A partir des broyats d'animaux naturellement infectés ou des suspensions de leurs déjections, on peut extraire puis purifier partiellement par des centrifugations différentielles, des particules bacilliformes d'environ 600 nm de long sur 300 nm de large (Pl. VI, Fig. 15). Expérimentalement, la reproduction de la maladie chez le scorpion fait suite à l'ingestion de ces particules qui sont donc des formes infectieuses.

En revanche, la maladie ne peut être reproduite lorsque ces formes infectieuses sont inoculées. Il y a donc au niveau de la transmission expérimentale de la maladie une différence importante avec les rickettsioses des autres arthropodes, dont l'étude expérimentale suit presque toujours des infections par inoculation. Cette particularité est au moins en partie liée aux réactions cellulaires de défense (Morel, 1976).

L'évolution de la maladie est lente, les animaux meurent à partir du 2ème mois qui suit le repas infectant ; la survie pouvant aller jusqu'à 8 mois. Il n'y a pas de symptômes particuliers permettant de diagnostiquer l'origine rickettsienne de la maladie, celle-ci ne peut être déterminée sans sacrifier l'animal que par l'examen des déjections en microscopie électronique. Celles des animaux malades renferment en effet des formes infectieuses. En fin de maladie, on note souvent un arrêt de prise de nourriture bien qu'au cours des 2 mois qui précèdent la mort, le comportement de capture subsiste. Le jeûne s'accompagne d'une baisse progressive d'activité. Ces deux symptômes -jeûne et inactivité- se rencontrent dans d'autres maladies du scorpion, comme la virose (Morel, 1975), ou des maladies vraisemblablement physiologiques et ne sont donc pas spécifiques.

C'est au cours de la seconde quinzaine du 2ème mois de maladie que des formes infectieuses réapparaissent dans les déjections; il semble donc,comme le suggère également les études histopathologiques,que le cycle de multiplication du germe soit bouclé en 6 ou 7 semaines.

2 - Histopathologie.

Après ingestion des formes infectieuses, des plages basophiles finement granulaires apparaissent dans le cytoplasme après quelques semaines. Ces plages correspondent d'après les examens en microscopie électronique à des microcolonies intravacuolaires du microorganisme.

Ces microcolonies sont décelables en microscopie optique à partir de la 6ème semaine de maladie ; elles mesurent alors de 3 à 4 µm de diamètre. Elles croissent ensuite progressivement pour atteindre un diamètre d'environ 30 µm (Pl. IV, Fig. 8).

Les particules composant ces microcolonies sont à la limite de la résolution du microscope optique mais ont des affinités tinctoriales qui permettent d'en distinguer deux catégories dans les microcolonies assez âgées. Après coloration de Castañeda (Humason, 1962), la périphérie des microcolonies est composée de particules d'assez grande taille se colorant en rose alors que la zone centrale renferme de très petites particules colorées en bleu par le bleu de méthylène. Dans la lumière des diverticules digestifs,des amas de rickettsies colorées en bleu sont visibles (Pl. IV, Fig. 9,10). Ces amas résultant de la lyse des cellules digestives sont presque uniquement composés par des formes infectieuses du microorganisme d'après les observations en microscopie électronique. Seul le tube digestif est atteint, les autres tissus dont le tissu interstitiel très proche sont sains. Après coloration de gram sur coupe selon la technique de Weigert, (Humason, 1962) les microcolonies sont roses ce qui traduit la gram-négativité du microorganisme.

Le développement des microcolonies semble débuter préférentiellement dans la région basale des cellules digestives. Les cellu-

les infectées renferment parfois plusieurs microcolonies ce qui suggère l'existence d'une autoinfection des cellules. Dans ce cas, il serait possible que dans les premiers stades du développement de la rickettsie, il y ait dissémination des premières formes végétatives formées à l'intérieur de la cellule hôte ; chacune d'elles donne naissance à une nouvelle colonie. Cependant, dans la majorité des cas, une seule microcolonie se développe dans les cellules infectées. Pouvant atteindre 40 um en fin de croissance, leur contenu est libéré à la suite de la lyse de la cellule hôte.

L'action cytopathogène est très importante, la quasi totalité des cellules de l'hépatopancréas est détruite et disparaît sans être remplacées (Pl. IV ; Fig. 10, 11).

3 - Microscopie électronique.

L'étude des coupes fines en microscopie électronique confirme la localisation intracytoplasmique des microorganismes. Se présentant sous divers aspects (Pl. V ; Fig. 12), ces derniers constituent des microcolonies contenues, au moins pendant un certains temps, à l'intérieur de vacuoles. Les microorganismes peuvent d'après leurs caractères ultrastructuraux et le moment de leur apparition dans les microcolonies, être répartis en trois groupes homogènes.

a) Vacuoles de développement et cycle.

Les plus petites microcolonies que l'on peut observer ne renferment que des particules sphériques (Pl. V ; Fig. 13) relativement claires aux électrons. Elles font vraisemblablement partie des microcolonies les plus jeunes. Les microcolonies croissent à la suite de la multiplication par division binaire (Pl. V ; Fig. 13, 14) des particules sphériques qui représentent donc des formes végétatives du microorganisme. Dans les microcolonies de plus grande taille (Pl. V ; Fig. 12), apparaissent parmi les formes végétatives des particules présentant une densification plus ou moins importante concomitante d'une perte de la forme sphérique (Pl. VIII). Certaines grandes microcolonies ne renfer-

ment que des formes très denses aux électrons, ovoïdes (Pl. VII) correspondant par leur taille et leur forme aux particules infectieuses (Pl. VI). Ce sont en effet les seules particules que l'on puisse observer sur les coupes de déjections des scorpions malades. Elles représentent donc la forme sous laquelle le microorganisme est disséminé dans le milieu extérieur c'est-à-dire la forme de résistance infectieuse puisque l'ingestion de suspensions de ces formes permet la reproduction de la maladie.

Les particules présentant une densification partielle (Pl. VIII) sont des formes intermédiaires qui assurent le passage entre les formes végétatives et les formes de résistance.

Il apparaît donc que le microorganisme se présente successivement dans les microcolonies sous trois formes : des formes végétatives se divisant par des divisions binaires, des formes de résistance infectieuses et des formes intermédiaires assurant le passage entre les deux formes précédentes. Ces trois genres de particules ont déjà été observés pour des microorganismes intracellulaires des invertébrés *(Rickettsiella)* et chez les vertébrés *(Chlamydia)*. Ils traduisent donc l'existence pour le microorganisme du scorpion d'un cycle de multiplication superposable à celui décrit chez les *Chlamydia* (Devauchelle et coll., 1971), et les *Rickettsiella* (Devauchelle et coll., 1972). Par analogie nous emploierons la terminologie utilisée au cours du cycle des Chlamydiacés : les corps initiaux correspondant aux formes végétatives, les corps élémentaires aux formes de résistance infectieuses et les corps intermédiaires aux formes assurant le passage entre les corps initiaux et les corps élémentaires.

En dehors des trois types de particules, les microcolonies renferment des vésicules limitées par une double membrane (Pl. V, Fig.14); ces vésicules de 30 à 120 nm de diamètre sont d'autant plus nombreuses que la microcolonie est âgée ; elles sont formées principalement lors de la division des microorganismes par bourgeonnement de la paroi des corps initiaux mais apparaissent également lors de la transformation des corps initiaux en corps élémentaires (Pl. VIII, Fig. 22).

La membrane des vacuoles n'est généralement pas visible dans sa totalité et il est possible qu'elle soit partiellement rompue.

b) Les corps initiaux. (Pl. V).

Les corps initiaux sont sphériques (Pl. V). Ils se divisent principalement par division binaire ; un étranglement progressif conduit à la formation de deux cellules filles (Pl. V , Fig. 13,14). Cependant, comme dans le cas du microorganisme décrit par Osaki (1973) des divisions donnant naissance à trois cellules simultanément peuvent se produire. Ils sont limités par une paroi de 120 Å d'épaisseur (30 Å, 40 Å, 50 Å, et une membrane cytoplasmique de 95 Å (30 Å, 35 Å, 30 Å) séparées par un large espace périplasmique de 100 à 250 Å d'épaisseur (Pl. V, Fig. 14). Les corps initiaux sont peu denses aux électrons, ils n'ont pas de nucléoïde individualisé mais montrent un réseau lâche de fibrilles au sein d'un cytoplasme plus ou moins granulaire. Les granules assimilables à des ribosomes sont surtout nombreux dans la zone corticale. Une membrane intracytoplasmique existe dans les corps initiaux (Pl. V, Fig. 14).

La taille des corps initiaux varie de 400 à 650 nm ; nous considérons que les particules de 500 à 650 nm de diamètre correspondent à des corps initiaux prêts à se diviser. Les corps initiaux de petite taille (400 nm de diamètre) sont souvent rattachés par un court pédoncule qui traduit une division récente (Pl. V, Fig. 12) et leur volume correspond au demi volume d'une particule de 500 nm de diamètre ; ces dernières proviennent vraisemblablement de la division des corps initiaux de 650 nm de diamètre.

c) Les corps élémentaires. (Pl. VI, VII).

D'après les coupes, les corps élémentaires sont en forme d'ovoïdes aplatis de 520 à 740 nm de long sur 230 à 250 nm de large et 90 à 100 nm d'épaisseur. Ils possèdent trois axes de symétrie perpendiculaires et se présentent donc selon trois aspects principaux dont la fréquence est à mettre en rapport avec leur forme particulière (Pl. VII, Fig. 16).

Les formes de 500 nm de long sur 250 nm de large sont les plus rares; en effet, une particule ne peut être coupée qu'une seule fois dans ce sens (Pl. VII, Fig. 18). Les formes de 500 nm sur 90 sont un peu plus fréquentes, la particule pouvant être coupée 2 à 3 fois (Pl. VII, Fig. 16). Les formes les plus nombreuses sont constituées par des coupes de 250 nm sur 90 nm puisque 5 à 6 coupes d'une même particule peuvent alors être obtenues (Pl. VII, Fig. 17). Du fait de la faible épaisseur des corps élémentaires, il est d'autre part très rare de rencontrer des formes du premier type suffisamment colorées pour en distinguer l'ultrastructure.

Les empilements de particules que l'on observe dans certaines vacuoles (Pl. VII, Fig. 16) résultent de l'aplatissement du microorganisme qui permet cette disposition.

Les corps élémentaires sont limités par un ensemble paroi - membrane de 225 Å d'épaisseur. Pentalaminaire cet ensemble se décompose en un feuillet dense externe de 50 à 60 Å, un feuillet clair externe de 35 Å, un feuillet dense médian de 60 Å, un feuillet clair interne de 35 Å et un feuillet dense interne très rarement visible, de 30 Å. Les deux feuillets denses les plus externes et le feuillet clair qui les sépare apparaissent souvent discontinus, conférant à la paroi un aspect perforé. Celle-ci semble composée de "sous-unités" denses aux électrons de 35 Å de large séparées par des espaces clairs de 25 Å environ (Pl. VII, Fig. 19). Le feuillet médian résulte de l'accolement du feuillet externe de la membrane cytoplasmique à la région basale de la paroi ; il n'existe pas d'espace périplasmique. La membrane cytoplasmique s'invagine en un point de la particule et est en relation avec une structure membranaire interne (Pl. VII, Fig. 17) assimilable à un mésosome.

L'intérieur des corps élémentaires est très dense aux électrons dans la région corticale, plus clair dans la région centrale où des granules ribosomiens régulièrement alignés sont visibles (Pl. VII ; Fig. 18). Ils sont situés sur deux ou trois plans parallèles ; chaque plan renfer-

ment trois ou quatre lignes de granules régulièrement espacées. Le système membranaire est visible dans la région périphérique au sein du matériel dense aux électrons. Ce dernier, fibrillaire, peut être assimilé à un nucléoïde d'après les études cytochimiques (Chapitre VII).

Les suspensions infectieuses étudiées en microscopie électronique après coloration négative par le phosphotungstate de sodium apparaissent composées d'un seul type de particules : les corps élémentaires (Pl. VI). Ovoïdes ils mesurent de 450 à 700 nm de long sur 240 à 320 nm de large (moyenne 620 ± 60 nm sur 300 ± 15 nm). Ils sont contrastés négativement de manière homogène ; cette absence d'un dépôt important de phosphotungstate à la surface des particules indique la bonne conservation de la structure de ces corps malgré les processus de purification et de coloration. Un très léger dépôt de phosphotungstate de sodium fait apparaître à la surface de ces particules une ornementation composée de granules de petite taille. Ils semblent dans certaines régions, être régulièrement disposés selon trois directions principales (symétrie d'ordre 3) et la distance de centre à centre entre deux granules voisins est de 110 à 135 Å. Cette observation apporte un élément supplémentaire sur la structure de la paroi. En effet, sur coupes fines, les "sous-unités" qui constituent la paroi paraissent souvent être réunies deux à deux par leur région apicale. L'intervalle entre le centre de deux couples successifs est de 110 Å environ, et correspond à peu près à celui séparant deux granules sur les corps élémentaires contrastés négativement. On peut donc supposer que les granules correspondent à des macromolécules cylindriques ou prismatiques d'environ 90 Å de largeur qui constitueraient en fait la paroi du microorganisme.

d) Les corps intermédiaires. (Pl. VIII)

La transformation des corps initiaux en corps élémentaires se traduit très rapidement par une diminution de taille des particules : le rapport du volume des corps élémentaires par rapport à celui des corps initiaux semble être compris entre 0,25 et 0,35. Au début de la transformation des corps initiaux, le cytoplasme s'éclaircit et

un nucléoide bien visible apparaît dans les particules. Ce nucléoïde est très excentrique (Pl. VIII, Fig. 21) mais peut paraître central en raison de l'orientation des particules dans le plan de coupe (Pl. VIII, Fig. 20). Ce regroupement de fibrilles se fait au contact de limites cellulaires restructurées (Pl. VIII, Fig. 22). A ce niveau on constate en effet la disparition de l'espace périplasmique, l'accolement de la membrane cytoplasmique à la paroi qui présente alors l'aspect perforé de la paroi des corps élémentaires. Le reste des limites cellulaires reste comparable à celles des corps initiaux. Les particules vont ensuite s'aplatir tandis que le nucléoïde continu à se développer à la périphérie des particules englobant peu à peu le cytoplasme résiduel et les ribosomes. C'est au moment de cette transformation qu'une partie au moins des nombreuses vésicules trouvées dans les vacuoles de développement se forme par de petits bourgeonnements de la paroi des particules (Pl. VIII, Fig. 22).

Les corps intermédiaires sont parfois réunis par un court pédoncule (Pl. VIII, Fig. 22), ce qui traduit une division récente. Les divisions généralement binaires sont dans de très rares cas triples (Pl. VIII, Fig. 20).

4 - Position systématique.

Par son cycle intracellulaire (corps élémentaire -corps initial - corps élémentaire), ce microorganisme est voisin de ceux appartenant aux genres *Rickettsiella* Philip, 1956 et *Chlamydia* Jones Rake et Stearns, 1945 . Les différences ultrastructurales qu'il présente avec ces microorganismes au cours de divers stades de son cycle sont suffisamment importantes pour qu'on ne puisse pas le considérer comme faisant partie de l'un de ces deux genres. Nous avons proposé, Morel (1976) son inclusion, dans l'ordre des Chlamydiales Storz et Page, 1971 dans lequel il représente un nouveau genre : le genre *Porochlamydia* dont l'espèce type est *Porochlamydia buthi* Morel, 1976.

En raison de la découverte ultérieure chez l'araignée *P. mirabilis* de deux microorganismes voisins (Morel, 1978) (Chapitre VI),

dont l'un ne se distingue du microorganisme décrit chez le scorpion que par de très faibles variations concernant la taille et la morphologie nous sommes amenés à proposer de légères modifications de la diagnose générique et la séparation de l'espèce *Porochlamydia buthi* en plusieurs sous-espèces.

Genre *Porochlamydia* : diagnose révisée.

Microorganismes gram-négatifs, non mobiles, parasites intracellulaires obligatoires. Ils possèdent un cycle de multiplication intracellulaire de type chlamydien, dont les stades principaux sont les suivants :

Corps initiaux : Formes végétatives du microorganisme, les corps initiaux se multiplient par divisions binaires. Ils sont limités par une paroi et une membrane cytoplasmique séparées par un espace périplasmique important. Ces limites, non rigides, permettent un pléomorphisme important. La membrane cytoplasmique est en relation avec un système membranaire interne. Le nucléoïde très dispersé dans le cytoplasme donne un aspect réticulé aux particules. Les corps initiaux se colorent en rose par la méthode de Castañeda.

Corps élémentaires : Les corps élémentaires représentent la forme de résistance infectieuse du microorganisme. Ils sont apparemment limité par un système pentalaminaire dû à l'absence d'espace périplasmique entre la paroi et la membrane cytoplasmique. La paroi présente un aspect perforé. Le nucléoïde est condensé et occupe une position latérale par rapport au cytoplasme. Les ribosomes sont disposés dans le cytoplasme selon un arrangement paracristallin. Un système membranaire bien développé en relation avec la membrane cytoplasmique existe dans le nucléoïde ou entre ce dernier et le cytoplasme. Ces corps sont colorés en bleu par la méthode de Castañeda.

Corps intermédiaires : Les corps intermédiaires sont les formes de transition entre les corps initiaux et les corps élémentaires. Ils montrent simultanément les limites de ces deux types de particules. Au cours de ce stade, le nucléoïde se dispose en couches denses au contact des limites cellulaires.

L'espèce type est *Porochlamydia buthi* isolée chez le scorpion *Buthus occitanus* Am. dans l'Hérault (France) (Morel, 1976).

Espèce *Porochlamydia buthi*. Diagnose révisée.

En dehors des caractères du genre, *P. buthi* se caractérise par des corps élémentaires en forme de bâtonnets aplatis de 400 à 700 nm de long sur 200 à 300 nm de large et 80 à 100 nm d'épaisseur. Le nucléoïde de ces corps est périphérique et entoure presque totalement le cytoplasme .

Sous-espèce : *Porochlamydia buthi ssp. buthi* ; *ssp. nov.* Possédant les caractères du genre *Porochlamydia* et ceux de l'espèce *Porochlamydia buthi* , cette sous-espèce se caractérise par son hôte le scorpion *Buthus occitanus* Am. et par la taille de ses corps élémentaires mesurés sur grilles après coloration négative au phosphotungstate de sodium, ces derniers mesurent en moyenne 620 nm de long sur 300 de large. Localité d'origine Prades-le-Lez (Hérault - France).

PLANCHE IV

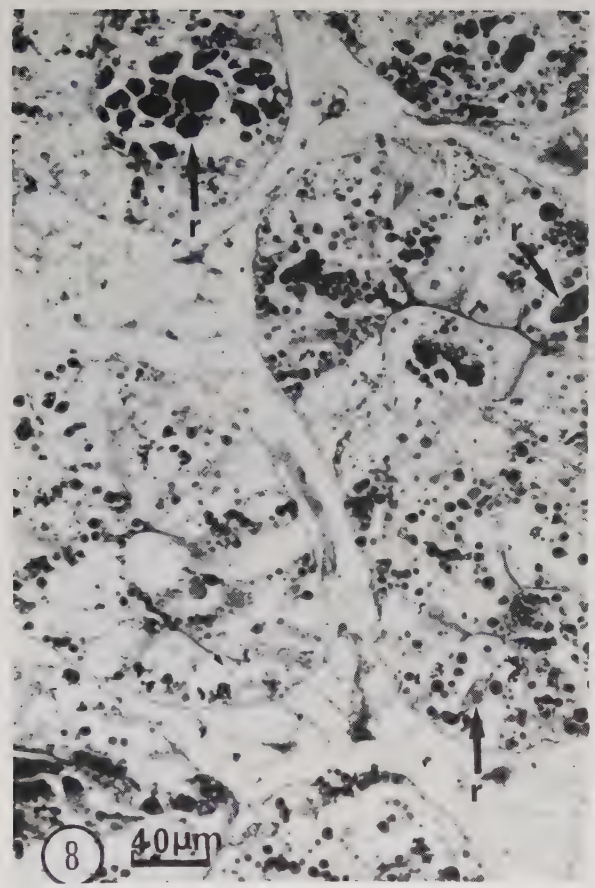
Rickettsiose de *Buthus occitanus*.
Histopathologie.

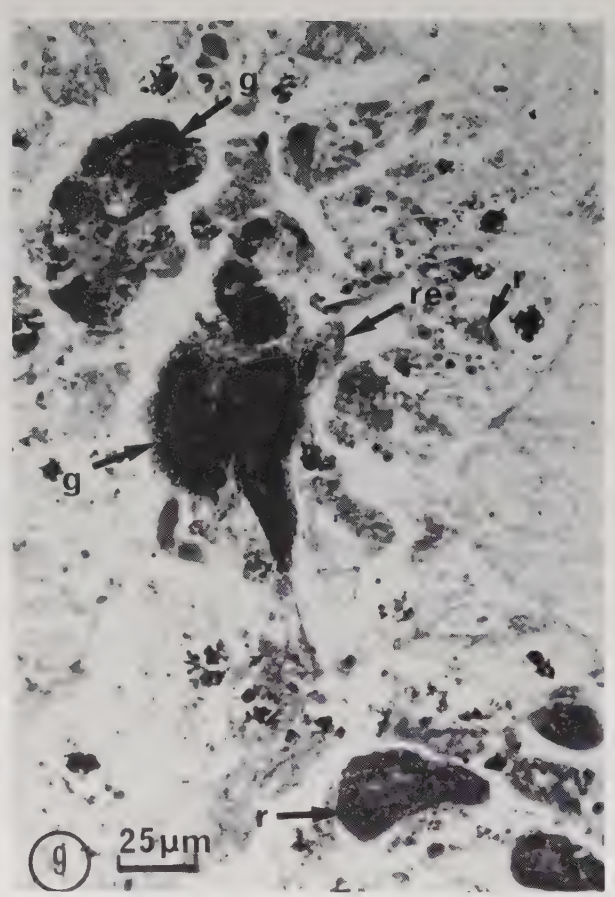
Fig. 8. : Au début de l'infection, quelques microcolonies (r) de la rickettsie *Porochlamydia buthi* sont visibles dans les cellules des diverticules digestifs. Coloration de Mann-Dominici. X 250.

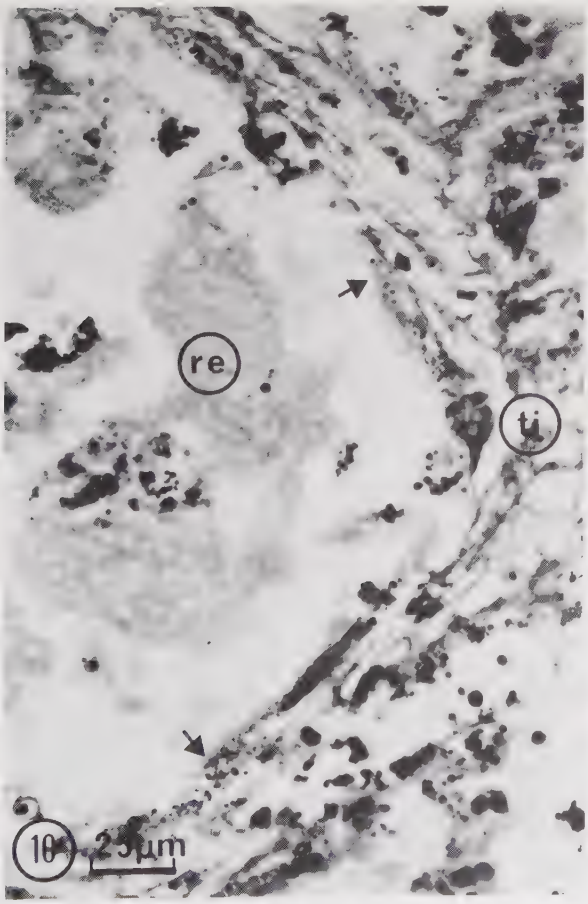
Fig. 9. : Après éclatement des cellules digestives, les microorganismes (re) sont rejetés dans la lumière des diverticules où on les observe mélangés à des amas de guanine (g). r : microcolonie de *Porochlamydia buthi*. Coloration de Mann-Dominici. X 420.

Fig. 10. : Aspect de l'hépatopancréas à un stade avancé de l'infection. Les cellules digestives ont disparu. Seul subsiste le tissu interstitiel (ti) non infecté. re : microorganismes libres dans la lumière du diverticule. Coloration de Mann-Dominici. X450.

Fig. 11. : A la suite d'une infection initiale massive, la totalité des diverticules est remplacée par des microcolonies de *Porochlamydia buthi* (r). Le tissu interstitiel (ti) ne contient pas de microorganisme. Coloration de Mann-Dominici. X 350.


r
r
r
8
40µm


g
re
r
g
r
9
25µm


re
ti
10
25µm

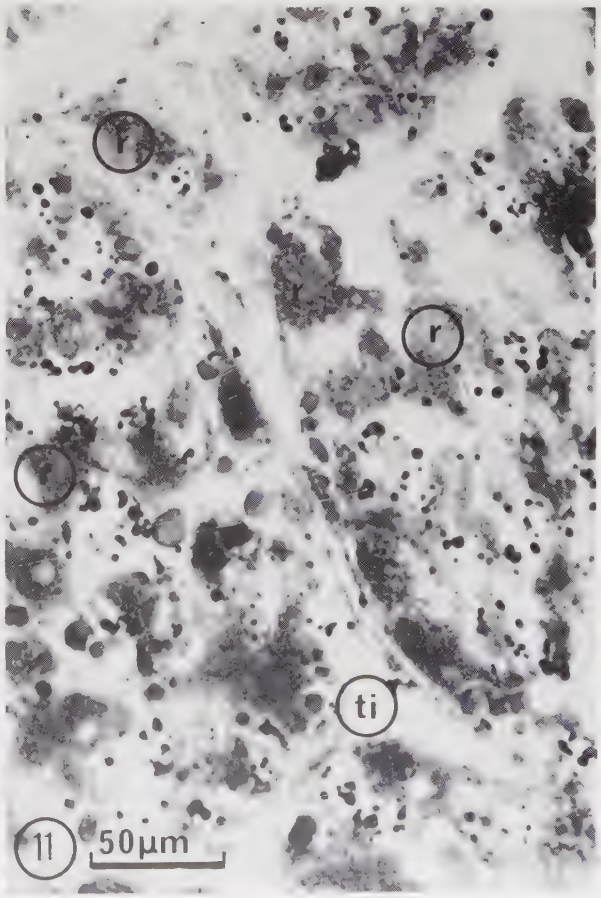

r
r
ti
11
50µm

PLANCHE V

Rickettsiose de *Buthus occitanus*.

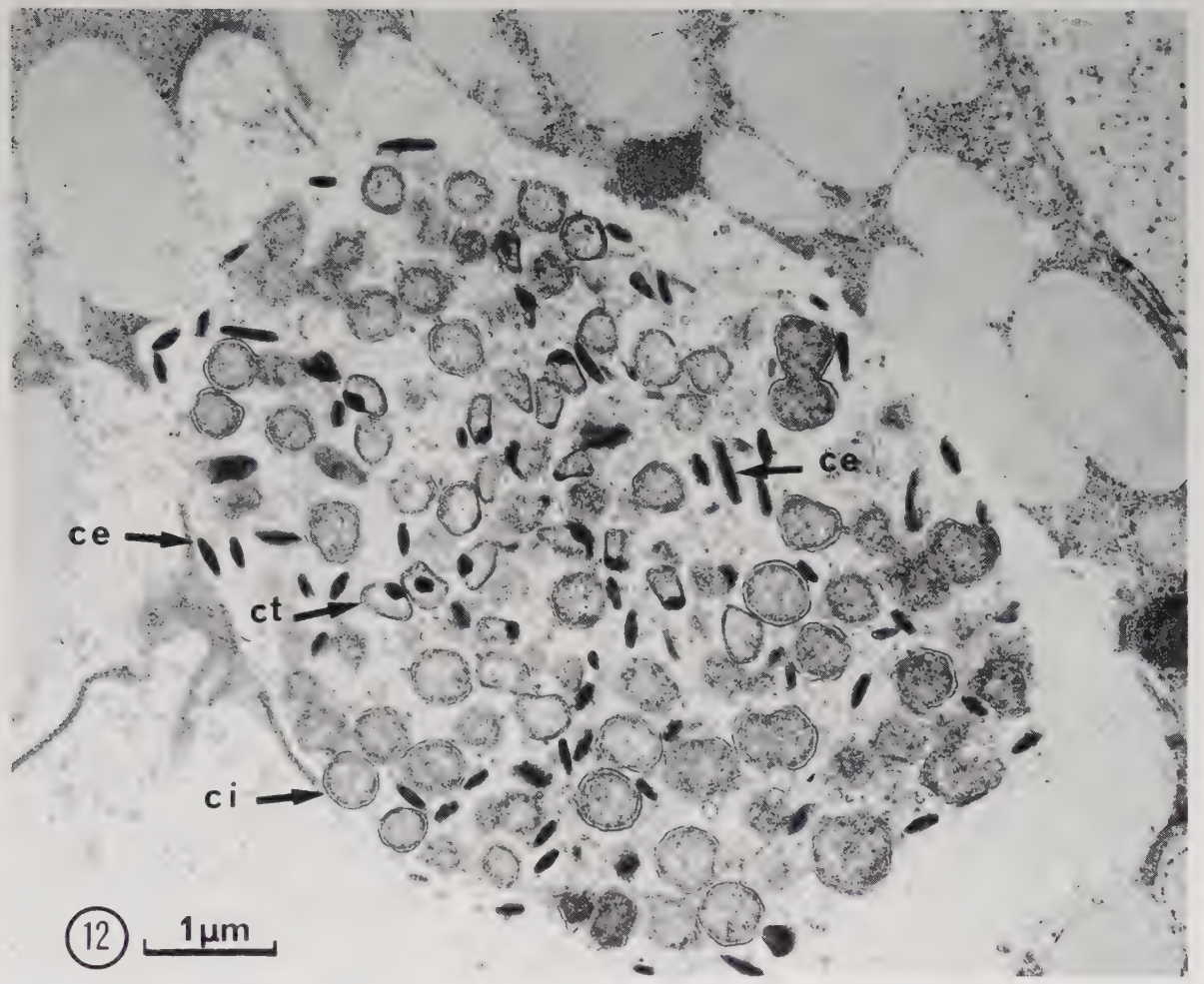
Porochlamydia buthi.

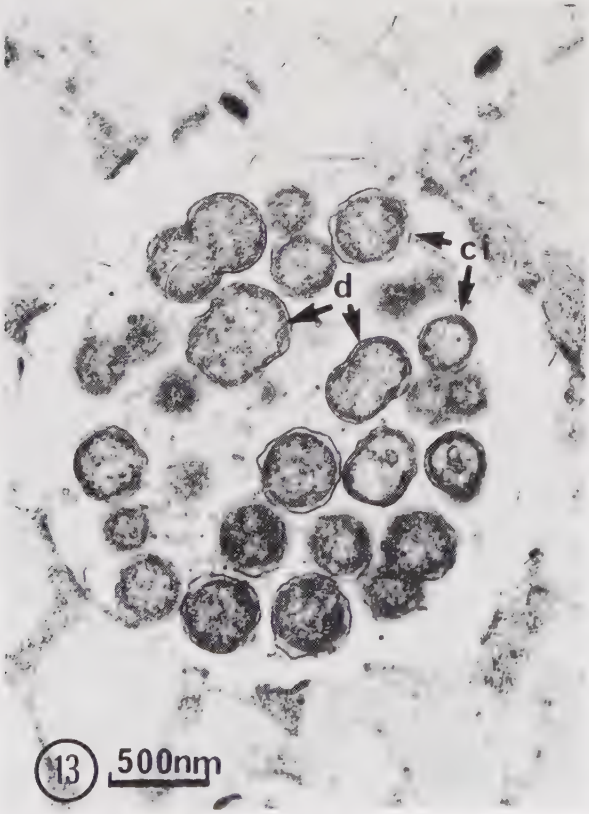
Ultrastructure des corps initiaux.

Fig. 12. : Microcolonie de *Porochlamydia buthi* renfermant les formes végétatives (ci), les formes de transition (ct) et les formes de résistance (ce) du microorganisme. X 17500.

Fig. 13. : Jeune microcolonie de *Porochlamydia buthi* ne renfermant que des corps initiaux (ci) dont certains sont en cours de division (d). X 26000.

Fig. 14. : Corps initiaux de *Porochlamydia buthi* en voie de division (d). La paroi (p) et la membrane cytoplasmique (m) sont visibles. On distingue dans les corps initiaux un système membranaire interne (mi), des ribosomes (r) et un réseau fibrillaire (f). Quelques vésicules (v) sont déjà visibles dans la vacuole entre les microorganismes. X 52000.


ce
ce
ct
ci
12
1µm


ci
d
13
500nm

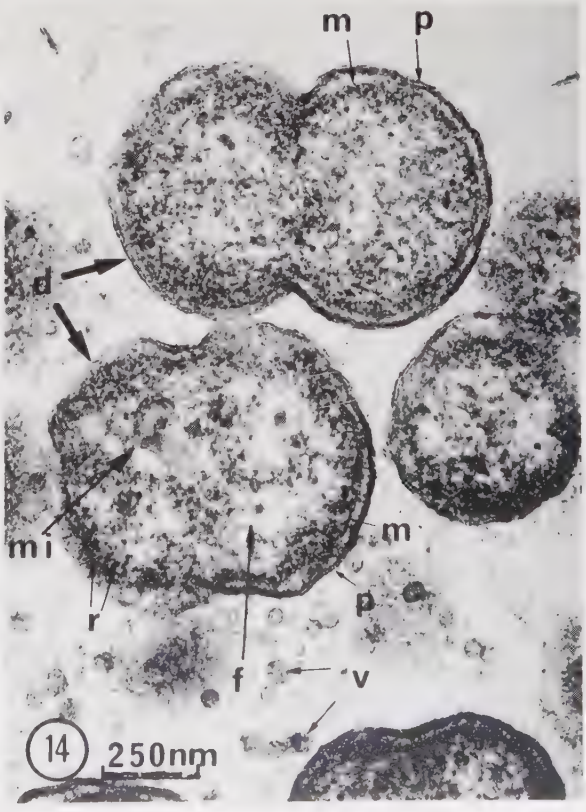

m
p
d
mi
m
p
r
f
v
14
250nm

PLANCHE VI

Rickettsiose de *Buthus occitanus*.

Porochlamydia buthi.

Ultrastructure des corps élémentaires.

Fig. 15. : Corps élémentaires (CE) de *Porochlamydia buthi* contrastés négativement par le phosphotungstate de sodium. Une ornementation est visible sur la surface des particules. X 185000.

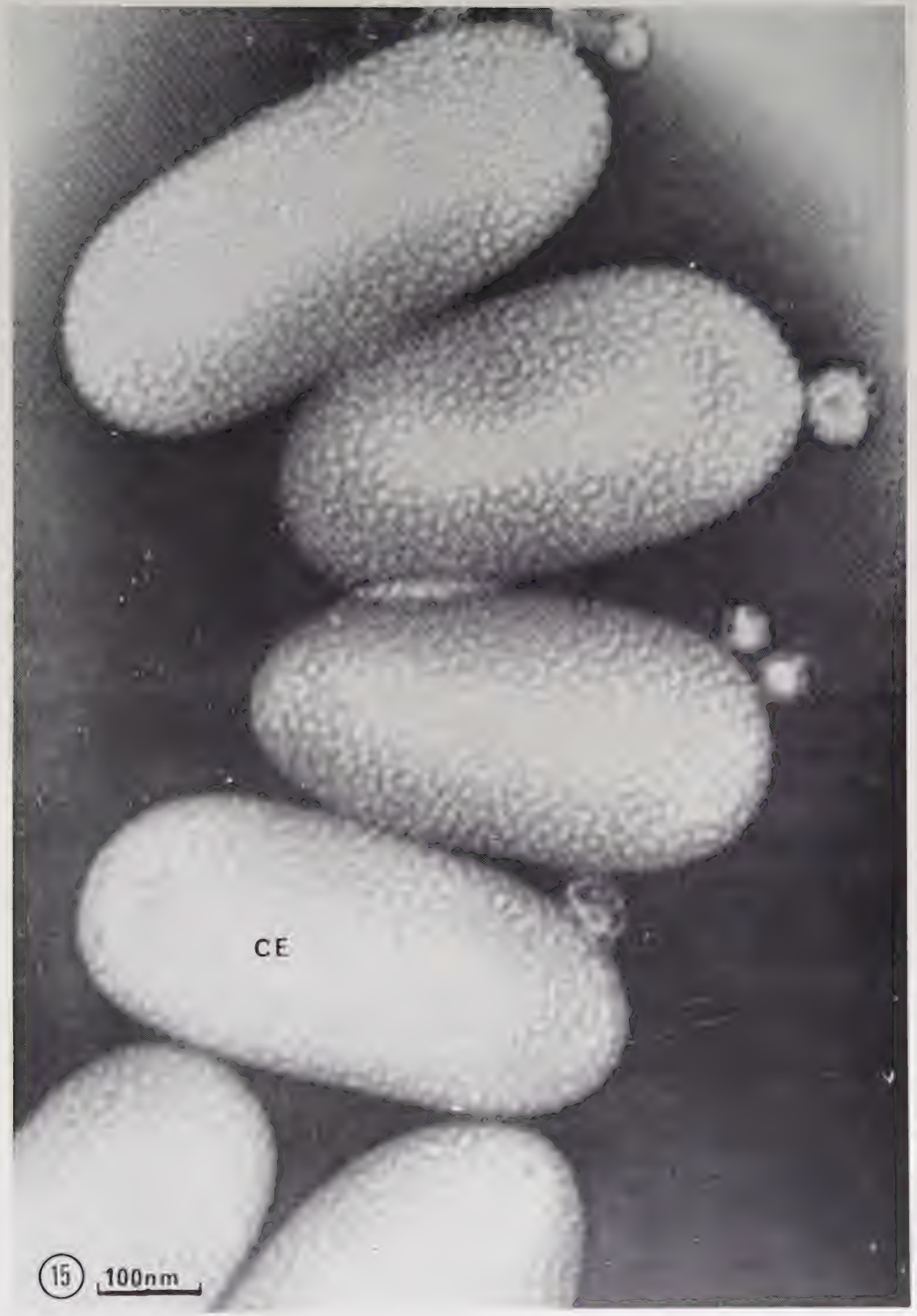

CE
15
100nm

PLANCHE VII

Rickettsiose de *Buthus occitanus*.

Porochlamydia buthi.

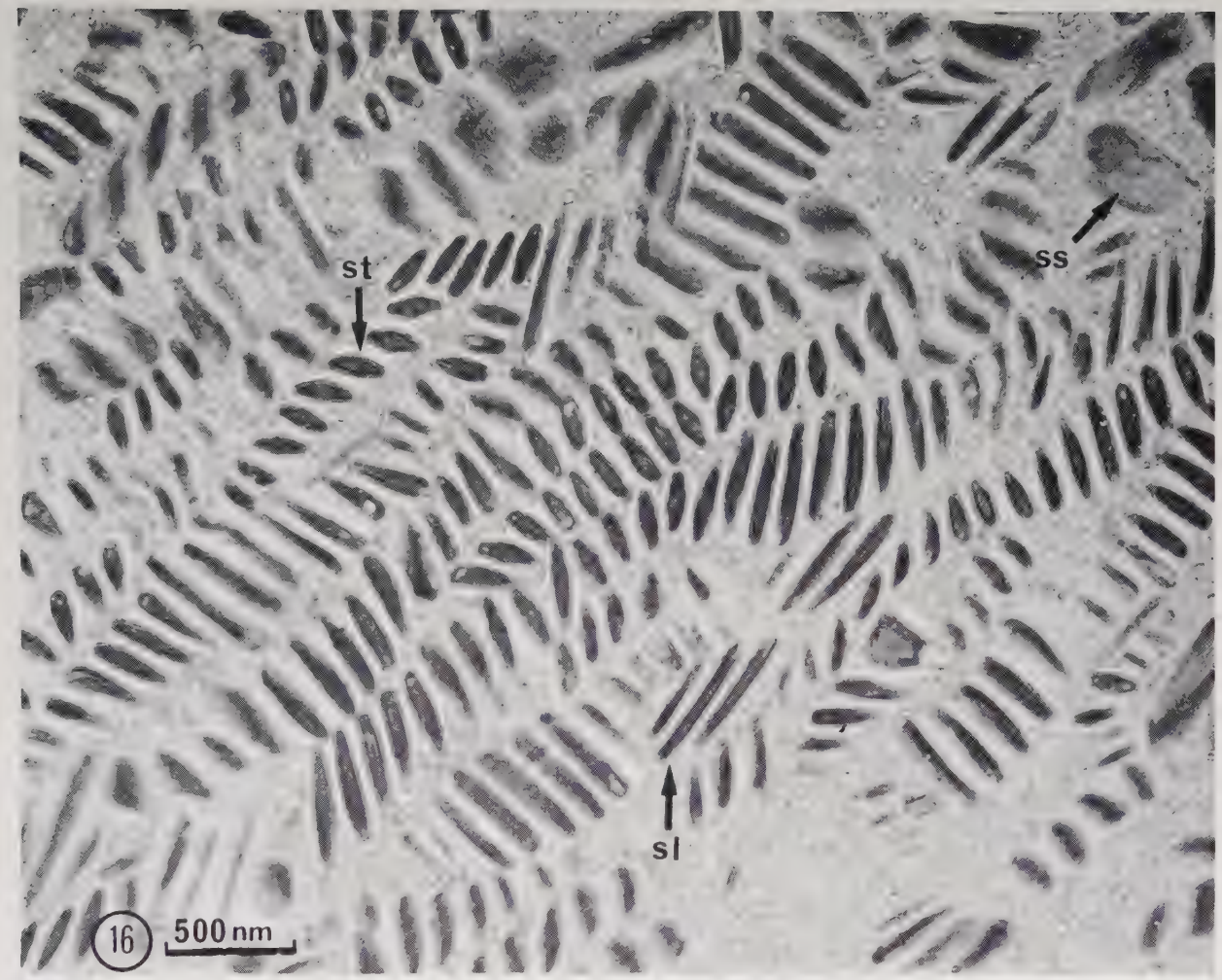
Ultrastructure des corps élémentaires.

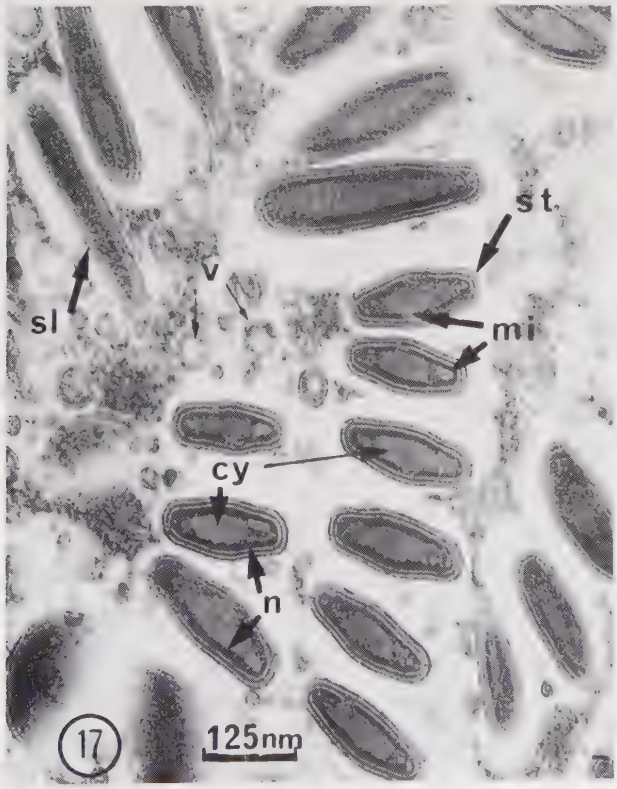
Fig. 16. : Section d'une microcolonie âgée de *Porochlamydia buthi* ne renfermant que des corps élémentaires. Corps élémentaires en section transversale (st) en section longitudinale (sl) et en section sagittale (ss). X 35000.

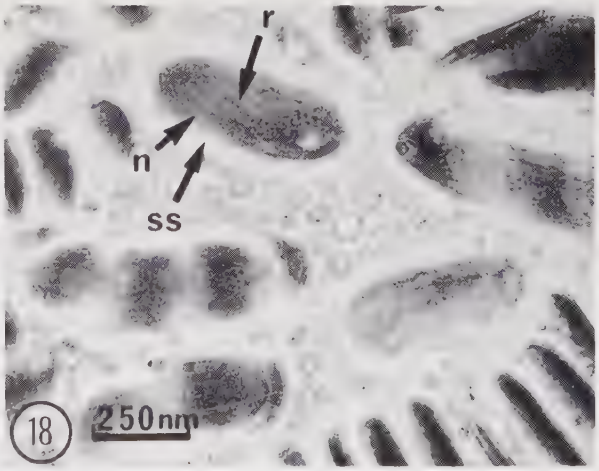
Fig. 17. : Détail des corps élémentaires coupés transversalement (st) ou longitudinalement (sl). Le cytoplasme (cy) est entouré par le nucléoïde (n). Le système membranaire interne (mi) est bien visible. v : vésicule. X 80000.

Fig. 18. : Détail des corps élémentaires en section sagittale (ss). Le nucléoïde (n) entoure le cytoplasme où les ribosomes (r) sont régulièrement disposés. X 52000.

Fig. 19. : Détail d'un corps élémentaire en section longitudinale. La paroi (p) paraît être perforée ►. X 150000.


st
ss
sl
16
500nm


st
v
sl
mi
cy
n
17
125nm


r
n
ss
18
250nm

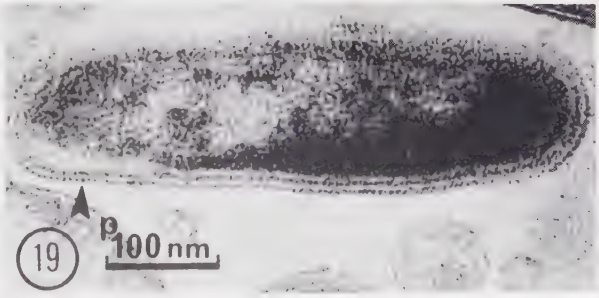

p
19
100nm

PLANCHE VIII

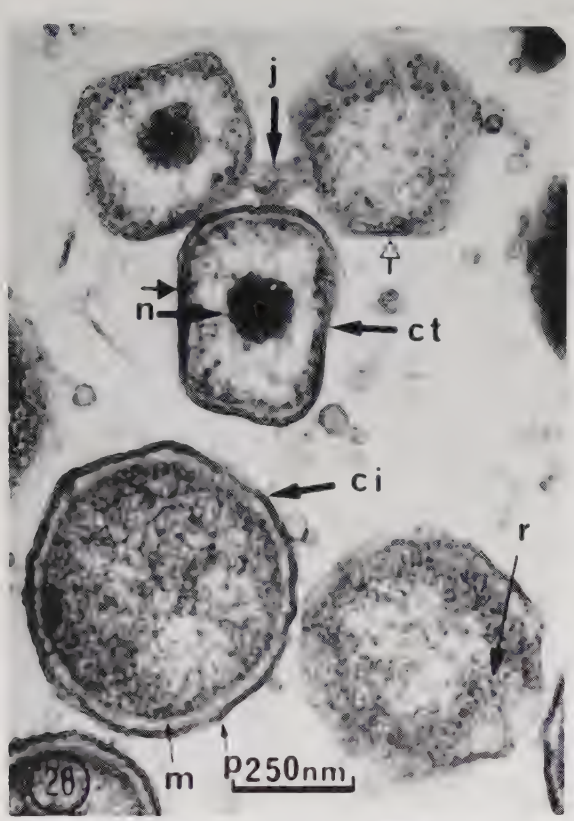
Rickettsiose de *Buthus occitanus*.

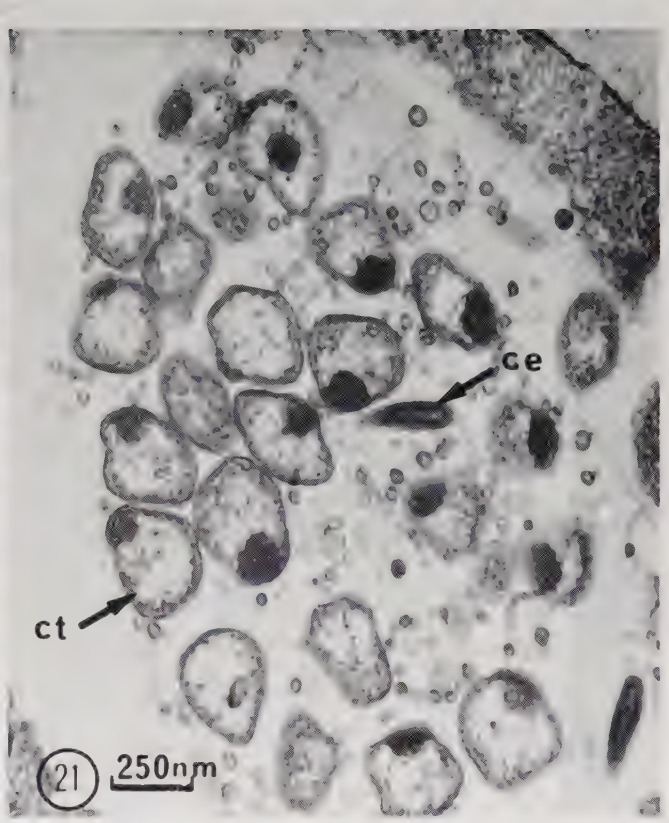
Porochlamydia buthi.

Ultrastructure des corps intermédiaires.

Fig. 20. : A côté des corps initiaux (ci) montrant une paroi (p) et une membrane cytoplasmique (m) typiques sont visibles des corps intermédiaires (ct) où l'on note une restructuration des limites cellulaires ➔ . Paroi à aspect perforé ⇨ . J : jonction triple, r : ribosomes, n : nucléoïde. X 65000.

Fig. 21 et 22. : Microcolonie composée de corps intermédiaires (ct) et de corps élémentaires (cé). On peut remarquer la disposition latérale du nucléoïde (n). Des vésicules (v) se forment au niveau d'une jonction (j). ➔ limites cellulaires restructurées le plus souvent au niveau du nucléoïde. ⇨: paroi à aspect perforé. X 130000.


j
n
ct
ci
r
m
20
250nm


ce
ct
21
250nm

n
n
ct
j
v
n
n
22
100nm

CHAPITRE V

ETUDE D'UNE RICKETTSIOSE CAUSEE PAR UN COMPLEXE *POROCHLAMYDIA BUTHI*-PHAGE CHEZ LE SCORPION *BUTHUS OCCITANUS* AM.

La découverte d'une infection virale chez le procaryote intracellulaire *Porochlamydia buthi* du scorpion *Buthus occitanus* a été faite au cours d'une étude histopathologique de scorpions infectés expérimentalement par cette rickettsie. Chez ces animaux, outre les plages rickettsiennes normales, on pouvait observer des plages intracytoplasmiques constituées de sphérules basophiles de grande taille (2 à 3 µm) (Pl.IX Fig. 23, 24) . L'examen au microscope électronique des déjections de ces scorpions ne permettaient pas de voir ces sphérules mais seulement d'observer les corps élémentaires de *P. buthi* associés à un grand nombre de particules parasphériques d'une soixantaine de nanomètres de diamètre présentant une queue très courte (Pl. XII, Fig. 32).

L'observation de ces particules d'allure virale pouvait traduire, soit le développement simultané de la rickettsiose et d'une virose du scorpion, soit en raison de la présence d'une queue ressemblant à celle des bactériophages, le développement de la rickettsiose et celui d'un phage de microorganisme. Dans cette dernière hypothèse, l'absence de bactéries visibles chez le scorpion impliquait le développement du phage chez la rickettsie elle-même.

Les résultats consécutifs à l'étude de la souche rickettsienne à l'origine de ces observations ont confirmé l'hypothèse d'une infection virale de la rickettsie (Morel et coll., 1974).

1- Pathogénie et histopathologie.

Les infections expérimentales de *B. occitanus* sont tout d'abord réalisées en faisant ingérer aux scorpions des suspensions renfermant à la fois les corps élémentaires de *P. buthi* et les particules

d'allure virale (Pl. XII, Fig. 32). Ces suspensions sont obtenues par des centrifugations différentielles des déjections et des broyats de tissus des animaux chez lesquels sont visibles lors d'examens histopathologiques des plages rickettsiennes et des plages intracellulaires composées de particules sphériques d'un diamètre de 2 à 3 µm fortement basophiles. L'infection à partir de ce matériel permet la reproduction de la maladie rickettsienne et l'obtention des caractères inhabituels précédemment signalés c'est-à-dire l'apparition de sphérules dans les cellules et des particules d'allure virale dans les déjections.

D'autres infections par voie buccale des scorpions ont été réalisées en utilisant, soit des particules d'allure virale seules purifiées par centrifugation en gradient de densité, soit des corps élémentaires de *P. buthi* provenant de scorpion chez lesquels seules des plages rickettsiennes d'allure normale sont observées, soit un mélange de ces corps élémentaires avec les particules d'allure virale purifiées. L'ingestion de particules d'allure virale seules ne donne aucun résultat ; celle des corps élémentaires seuls entraîne le développement chez les scorpions d'une rickettsiose normale, comparable à celle décrite dans le chapitre précédent. Seule l'ingestion simultanée des particules d'allure virale et des corps élémentaires de *P. buthi* permet de reproduire les symptômes ayant motivé cette étude.

L'obtention de nouvelles particules d'allure virale est donc liée à la présence simultanée dans le matériel infectant de ces particules et des formes de résistance de la rickettsie.

La pathogénie de la souche rickettsienne associée aux particules d'allure virale est identique à celle de *P. buthi* précédemment étudiée ; l'évolution de la maladie est lente, les particules d'allure virale apparaissent dans les déjections en compagnie des corps élémentaires du microorganisme à partir de la sixième semaine d'infection et sont régulièrement éliminées jusqu'à la mort de l'animal.

Seul l'hépatopancréas est le site de développement du microorganisme et celui de l'apparition de plages constituées de sphérules

basophiles. Les premières plages sont décelées en microscopie optique au bout de 6 semaines d'infection ; les corps élémentaires ainsi que des sphérules sont observés à partir de la 7è semaine dans la lumière des diverticules digestifs dont les cellules sont progressivement détruites.

Les coupes histologiques montrent qu'il existe une séparation nette entre les colonies normales de *P. buthi* et les plages renfermant les sphérules (Pl.IX, Fig. 23,24). L'observation des coupes semi-fines permet de constater qu'il n'apparaît jamais de sphérules parmi les corps élémentaires des microorganismes (Pl.IX, Fig. 25). La coloration des sphérules est identique à celle des corps initiaux ; seule l'intensité de cette coloration est plus importante. Elles sont par ailleurs nettement gram-négatif. Dans les sections de déjections, elles apparaissent mélangées avec les corps élémentaires ; ce mélange se produit dans la lumière des diverticules à la suite de la lyse des cellules parasitées.

2 - Microscopie électronique (Etude des coupes fines).

Comme en microscopie optique, on observe au microscope électronique, deux types de vacuoles d'origine rickettsienne, dans les cellules de l'hépatopancréas ; ce sont des vacuoles de développement typiques de *P. buthi* et des vacuoles renfermant principalement des corps sphériques de grande taille (Pl. X, Fig. 26).

Dans les vacuoles normales ne sont observées que les trois formes précédemment décrites pour *P. buthi* : les corps initiaux, les corps intermédiaires et les corps élémentaires.

Dans les vacuoles de développement non typiques sont rencontrés quelques corps élémentaires de *P. buthi* mais surtout des sphérules de 0,8 à 1,2 µm de diamètre rappelant les corps initiaux de *P. buthi* et des sphérules de 1,2 à 3 µm de diamètre renfermant des particules d'allure virale (Pl. X, Fig. 27 ; Pl. XI, Fig. 28).

Les sphérules de 0,8 à 1,2 µm de diamètre sont limitées par deux doubles membranes séparées par un espace périplasmique. Elles sont légèrement denses aux électrons, leur zone centrale renferme un fin réseau de fibrilles, leur zone corticale est granulaire. Ces sphérules sont souvent doubles ce qui suggère une division par étranglement (Pl. X, Fig. 27 ; Pl. XI, Fig. 28).

Les sphérules de 1,2 à 3 µm de diamètre sont également limitées par deux doubles membranes. On y observe des particules d'allure virale qui sont généralement disposées dans la région corticale mais peuvent occuper la totalité de ces sphérules.

Les particules mesurent environ 60 nm de diamètre, généralement parasphériques, elles montrent cependant parfois des contours polyédriques (Pl. XI, Fig. 29). On y distingue une zone externe légèrement dense aux électrons et une zone centrale entièrement colorée ou présentant sur certaines préparations un croissant dense en position latérale et une zone claire (Pl. X, Fig. 27). Quelques particules, dans de très rares cas, apparaissent libres dans les vacuoles entre les sphérules.

L'origine rickettsienne de la deuxième catégorie de vacuoles est attestée par la présence de quelques corps élémentaires de *P. buthi* et l'existence de membranes chez les sphérules. Ces vacuoles renferment donc des microcolonies de *P. buthi* présentant un aspect différent du fait de la présence du virus. La morphogenèse de celui-ci s'accomplit lorsque les microorganismes sont au stade des corps initiaux ; la structure des sphérules de petite taille est en effet celle de ces corps. L'attaque virale semble limiter la multiplication de *P. buthi*. En effet bien que les microcolonies soient alors de grande taille, le nombre des sphérules qui les composent est relativement faible par rapport à celui des microorganismes des vacuoles normales.

La virogenèse s'accompagne donc, d'une part d'un accroissement très important de la taille des particules rickettsiennes qui est à mettre en relation avec la plasticité des limites cellulaires des corps initiaux qui semble exister dans ce genre de microorganismes, d'autre part d'une diminution du nombre des divisions des corps initiaux.

Sur les coupes ces cellules sanguines de scorpions infectés par inoculation, on constate la fixation des particules sur les corps élémentaires du microorganisme dans les vacuoles de phogocytoses (Pl. XI, Fig. 30,31).

3 - Etude du virus.

a) Caractères biochimiques du virus.

Pour cette étude, les virus ont été séparés des corps élémentaires de *P. buthi* par des centrifugations en gradient de densité de saccharose.

La détermination de l'acide nucléique du virus (Morel et coll., 1974) a été faite selon la technique de Giles et Myers (1965). Elle a permis de mettre en évidence de l'acide désoxyribonucléique ; l'utilisation de la technique de Mejbaum (1939) qui permet de mettre en évidence les acides ribonucléiques donne un résultat négatif. Le dosage des protéines virales selon la méthode de Hartree (1972) permet de déduire la proportion d'acide nucléique du virus ; celle-ci s'élève à 39 %. Cette forte teneur en ADN nous a permis de déterminer le nombre de chaînes composant le génome viral sans l'extraire des particules ; les protéines quantitativement peu importantes par rapport à l'acide nucléique pour un virus de cette taille n'influençent pas le résultat des mesures photométriques.

L'adjonction de formol à la suspension virale est suivie de sa fixation sur les radicaux amines libres de l'ADN. Cette fixation entraîne une absorption plus forte de la suspension dans la zone des 260 nm. Au bout de 20 heures, la fixation du formol est totale et l'absorption n'augmente plus. L'hyperchromicité est alors de 6 %. En chauffant 10 mn la suspension virale à 100°C, on obtient après adjonction de formol une hyperchromicité de 26 % au bout de 20 heures. Cette augmentation importante indique que l'élévation de température a libéré de nouveaux radicaux amines où le formol a pu se fixer et donc que l'ADN est bicaténaire.

b) Caractères morphologiques du virus. Pl. XIII.

Dans les broyats des tissus et des déjections contrastées négativement par le phosphotungstate de sodium (APT), les sphérules ne sont pas visibles, ce qui dénote leur fragilité identique à celle des corps initiaux de la rickettsie. En revanche, on observe, à côté des corps élémentaires de *P. buthi*, un grand nombre de particules parasphériques ou polyédriques de 60 à 70 nm de diamètre possédant une queue courte de 15 nm de long. Ces particules paraissent souvent fixées sur les corps élémentaires de *P. buthi*. (Pl. XII, Fig. 32).

L'étude morphologique a été faite sur des suspensions de virus plus ou moins purifiées. L'APT les contraste négativement c'est-à-dire que l'on observe après ce type de préparation les virus autour desquels s'est déposée une substance opaque aux électrons. L'importance du dépôt sur certaines parties du virus agit comme un masque et les formes observées correspondent donc à des vues plus ou moins complètes de la surface supérieure des particules. A la suite de ces colorations, les particules virales présentent des formes généralement polyédriques. La variété des formes observées ne permet cependant pas de déterminer directement l'architecture de la tête du virus. (Pl. XIII, Fig. 34).

Une première précision est apportée par les suspensions colorées par l'acétate d'uranyle (Pl. XIII, Fig. 35). Dans ce cas, le colorant qui donne une très légère coloration négative, pénètre à l'intérieur des particules. Ce n'est donc plus la surface de la particule qui est observée mais sa totalité. Dans ce cas les virus se présentent sous forme d'hexagones réguliers ou légèrement aplatis ou sous forme de pentagones. Ces trois formes possèdent respectivement des symétries de type 3, 2 et 5. Cette triple symétrie correspond à celle d'un volume icosaèdrique (polyèdre à 20 faces, 12 sommets et 30 arêtes).

Cette forme icosaèdrique a été vérifiée sur les préparations contrastées par l'APT où les particules se présentent sous l'aspect de losanges, de rectangles, d'hexagones, etc. Plus les préparations sont purifiées, plus la fréquence de formes bien définies est importante. Les particules peuvent en effet se déposer sur le film de col-

lodion soit sur une face (position la plus stable) dans ce cas la particule se présente sous forme d'un hexagone régulier, (Pl. XIII, Fig. 37 a-b), soit sur une arête (forme d'hexagone aplati) (Pl. XIII, Fig. 37 e-f) ou sur un sommet (position la plus instable) forme de pentagone (Pl. XIII, Fig. 37 c-d). La proportion d'impureté présente va donc favoriser le dépôt des particules dans des positions théoriquement instables, et entraîner une grande variété d'aspect des virus.

Pour retrouver sur les clichés les trois aspects caractéristiques d'un icosaèdre, nous avons comparé les particules observées à des photographies d'un modèle icosaèdrique. Par ce procédé, divers aspects des virus peuvent être ramenés à l'une des figures du modèle photographié dans les diverses positions théoriquement les plus fréquentes.

Sur certaines préparations notamment après coloration par l'acétate d'uranyl (Pl. XIII, Fig. 35 a-b) ou sur coupe de culot de virus (Pl. XIII, Fig. 36), on peut observer des sous-unités au niveau de la capside ce qui semble indiquer que cette dernière serait composée de capsomères.

La queue est fixée sur l'un des sommets de l'icosaèdre ; longue de 15 nm et large de 10 nm, elle ne semble pas posséder de plaque basale. Comme de nombreux phages du groupe CI (Ackermann 1969), elle possède des crampons (Pl. XIII, Fig. 34,37). Ceux-ci, au moins au nombre de deux, sont formés d'une tige basale de 18 nm de long portant un groupe de trois fibres de même longueur disposées en éventail. L'ensemble a un aspect en balancier caractéristique, identique à celui noté par Vieu et coll. (1965) chez le phage $\mathcal{E}_{15}$ des Salmonelles.

4 - Discussion.

Un virus proche morphologiquement des bactériophages se développe chez *Porochlamydia buthi buthi*. Possédant un ADN bicaténaire, il est de symétrie binaire en raison de la présence d'une queue courte et sa tête est isométrique. On peut donc le placer parmi les phages

caudés du groupe C1 (Ackermann, 1969). Bien qu'une structure icosaèdrique ait été proposée, pour 6 % des phages à tête isométrique répertoriés par Ackermann (1969), cet auteur ne considère pas comme certaine ce type d'architecture virale. Cependant nous considérons que le phage de *P. buthi* est de forme icosaèdrique.

Ce virus est l'un des rares de ceux qui s'attaquent à des microorganismes intracellulaires et le développement de l'hôte à l'intérieur de cellules pose le problème de la contamination du microorganisme.

Si rien n'est encore connu quant à la transmission des autres phages de procaryotes intracellulaires (Maramorosh et coll., 1975 ; Harshbarger et coll., 1977 ; Buchanan, 1978 ; Wright et coll., 1978) certaines de nos observations indiquent que dans le cas du phage de *P. buthi* la contamination du microorganisme a lieu hors des cellules. Le principal point en faveur de cette hypothèse est l'absence de colonie mixte renfermant à la fois des microorganismes sains et des microorganismes virosés. En effet, la contamination intracellulaire pourrait se faire par pénétration d'un ou plusieurs virus dans la vacuole de développement ; dans ce cas il est peu vraisemblable qu'il entre autant de virus qu'il y a de microorganismes disponibles et l'on devrait donc observer dans certains cas, de nombreuses rickettsies non malades à côté des sphérules renfermant les virus, dans d'autres cas, la présence du surplus du virus ayant pénétré dans la vacuole. Dans le cas où la pénétration du virus serait tardive, on devrait observer les corps élémentaires qui auraient été formés avant l'infection virale. D'un autre côté, l'infection d'une microcolonie par libération du contenu d'une sphérule devrait conduire à l'observation d'un grande nombre de particules virales dans les vacuoles entre des microorganismes sains ou virosés. Or nos observations montrent d'une part, que tous les microorganismes d'une microcolonie sont soit sains soit sous forme de sphérules accompagnées d'un nombre extrêmement faible de corps élémentaires et d'autre part, que les virus libres sont exceptionnels. La seconde observation en faveur de l'infection du microorganisme hors des cellules est celle des particules virales qui paraissent fixées sur les corps élémentaires de *P. buthi* (Pl. XI, Fig. 30,31 ; Pl. XII, Fig. 32,33).

Nous pensons donc que *P. buthi* est infecté lorsque le microorganisme est sous sa forme de résistance et que chaque microcolonie provient de la multiplication d'une seule forme infectieuse et constitue donc un clone. Ces deux points ont pour corollaire que l'ADN du phage est répliqué dans les corps initiaux puisque toutes les cellules filles issues du premier corps initial sont porteuses du virus. Le phage se comporte donc alors comme un phage tempéré. Dans un second temps, la morphogenèse virale a lieu chez les cellules filles et le phage se comporte alors comme un phage virulent.

Les phages de bactéries ne peuvent pas être classé en bactériophages virulents ou tempérés car ce caractère est fonction de la souche bactérienne qu'ils attaquent (Bradley, 1967). Cette souche étant lysogène ou sensible. La lysogénie, c'est-à-dire la production de bactériophages par une bactérie lysogène, peut être spontanée ou induite par des facteurs chimiques ou physiques. Dans le cas où la lysogénie est spontanée, elle n'atteint qu'une très faible proportion des bactéries présentes dans la colonie. Les autres cellules de la souche étant immunes contre le phage considéré, la présence des virus libérés ne peut être révélée que par l'utilisation d'une souche bactérienne sensible non lysogène.

Dans le cas du phage étudié, *P. buthi* se comporte tout d'abord comme une souche lysogène, puis il y a au cours du cycle du microorganisme induction de la lysogénie dans la quasi totalité des cellules ricketsiennes. Il est impossible de déterminer quel est actuellement le facteur responsable de cette induction : facteur présent dans la vacuole de développement et lié au métabolisme des microorganismes, ou facteur interne à ces derniers lié au cycle du microorganisme , plus précisement à la transformation des formes végétatives en formes de résistances?

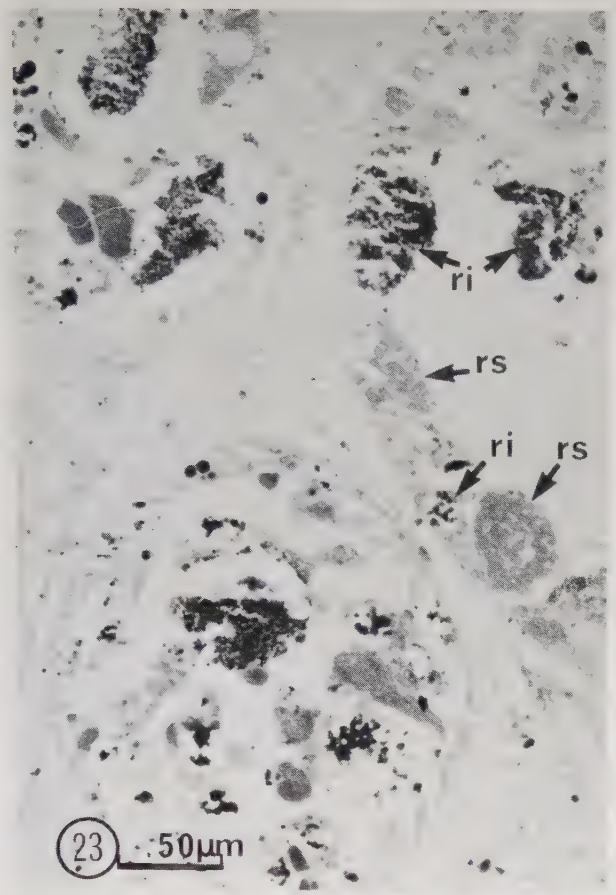
PLANCHE IX

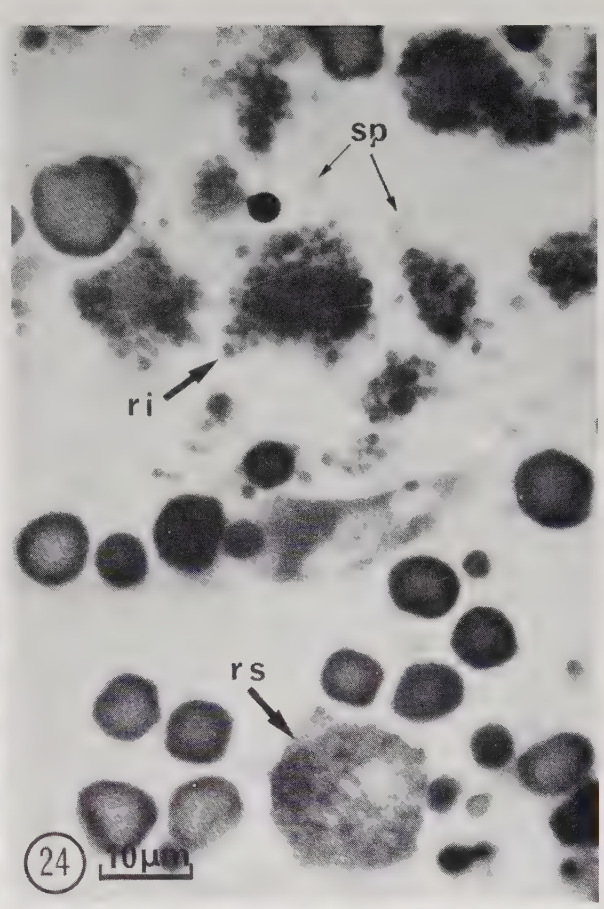
Rickettsiose de *Buthus occitanus*
Phage de *Porochlamydia buthi*.
Histopathologie.

Fig. 23. : Section d'hépatopancréas de scorpion montrant les colonies saines (rs) et infectées (ri) du microorganisme. Coloration de Mann-Dominici. X 270.

Fig. 24. : Microcolonies infectées (ri) et saines (rs) de *Porochlamydia buthi*. Les rickettsies infectées (sp) sont nettement visibles. Coloration de Mann-Dominici. X 1250.

Fig. 25. : Les microcolonies infectées (RI) renferment des sphérules (sp) de grande taille alors que dans les microcolonies saines (RS) les microorganismes sont à la limite de la visibilité. On note l'homogénéité des deux types de microcolonies. Coupe semi-fine, coloration au bleu de toluidine boraté. X 1750.


ri
rs
ri
rs
23
50µm


sp
ri
rs
24
10µm

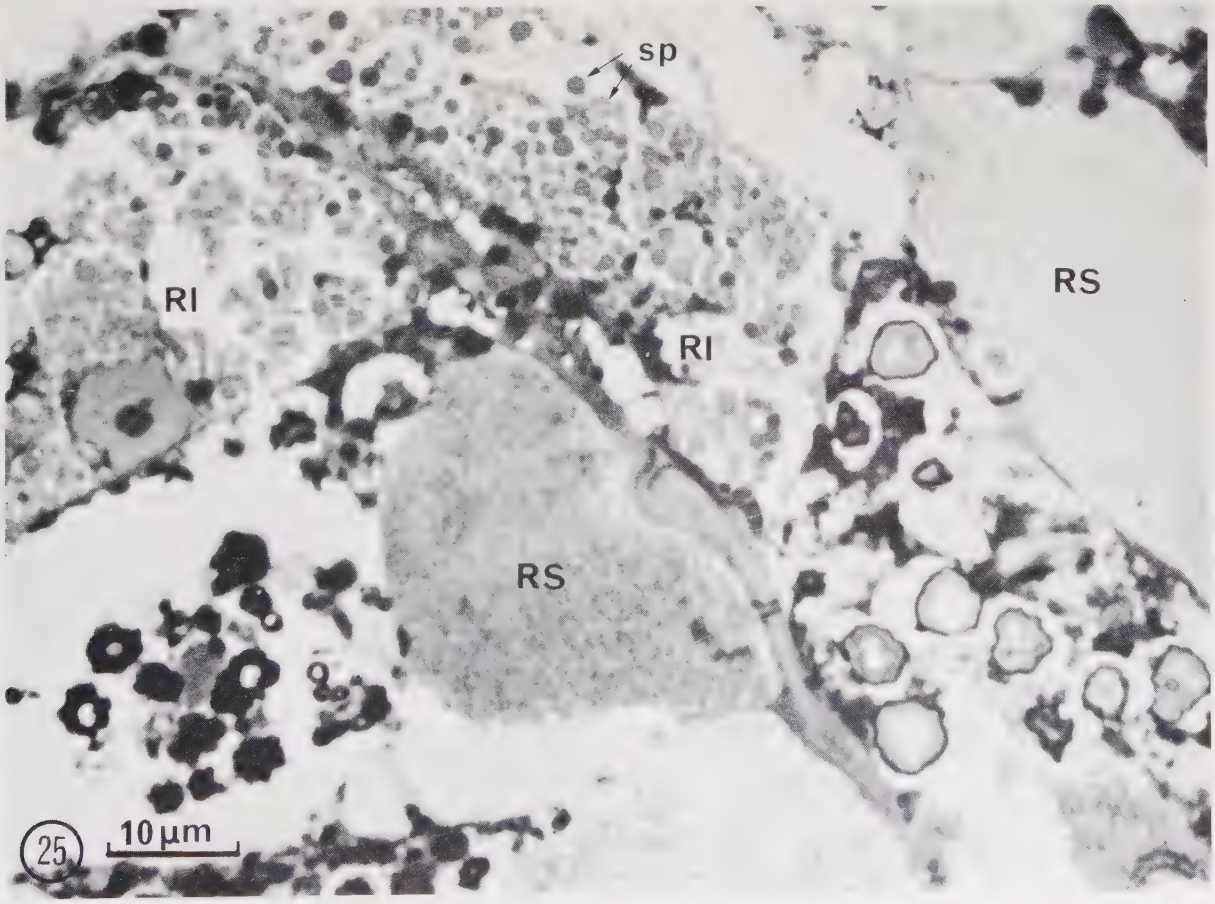
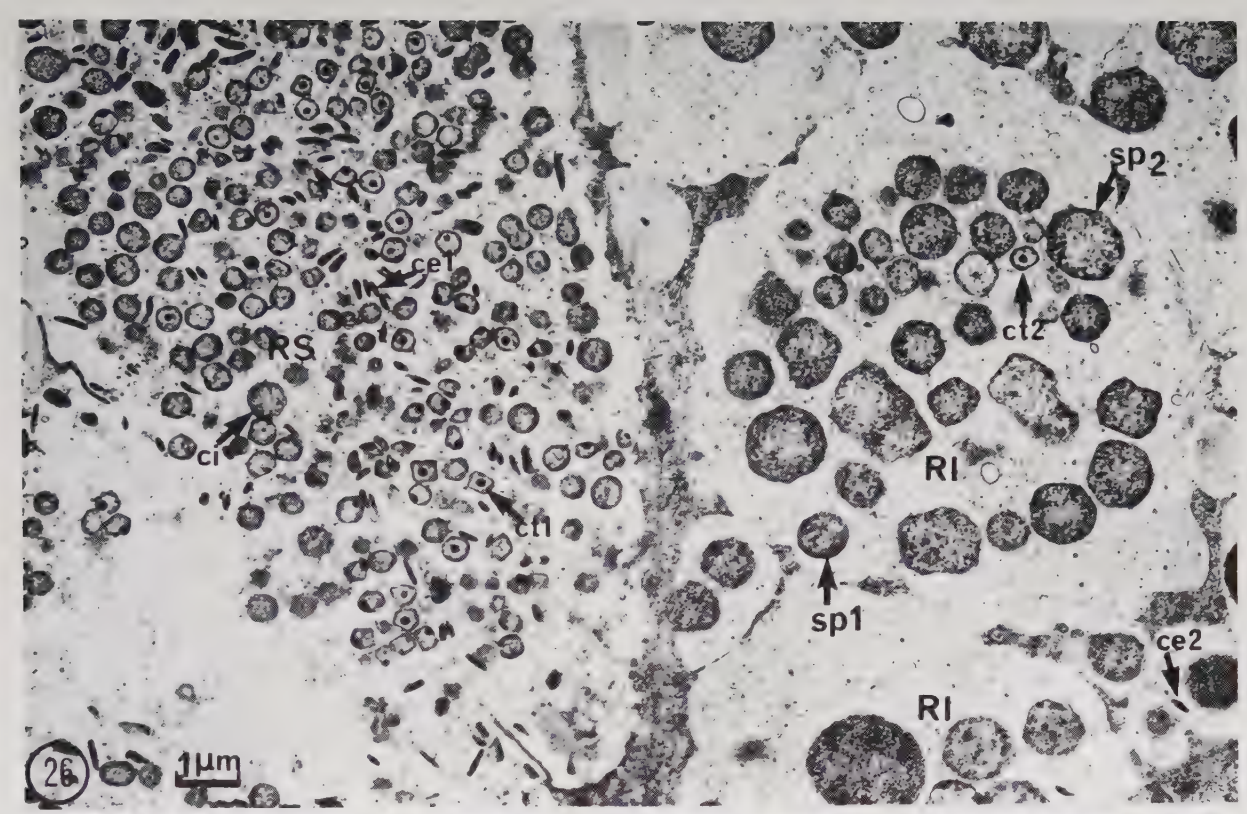

sp
RI
RI
RS
RS
25
10 µm

PLANCHE X

Rickettsiose de *Buthus occitanus*
Phage de *Porochlamydia buthi*.
Morphogenèse.

Fig. 26. : Les microcolonies de rickettsies infectées (RI) voisinent avec celles de rickettsies saines (RS). Les virus apparaissent dans des corps initiaux de grande taille (sp2) ; avant la virogenèse, les corps initiaux infectés (sp1) montrent un accroissement de taille par rapport aux corps initiaux sains (ci). De rares micro-organismes évoluent normalement dans les microcolonies infectées (ct2 et ce2) ; ils sont alors comparables aux corps de transition (ct1) et aux corps élémentaires (ce1) des microcolonies saines. X 8000.

Fig. 27. : Détail d'une microcolonie de rickettsies infectées. Les virus (v) sont visibles dans les sphérules de grande taille (sp2). Des formes de divisions (►) sont fréquentés chez les sphérules de petites tailles (sp1). X 30000.


ce1
RS
ci
ct1
sp2
ct2
RI
sp1
ce2
RI
26
1µm

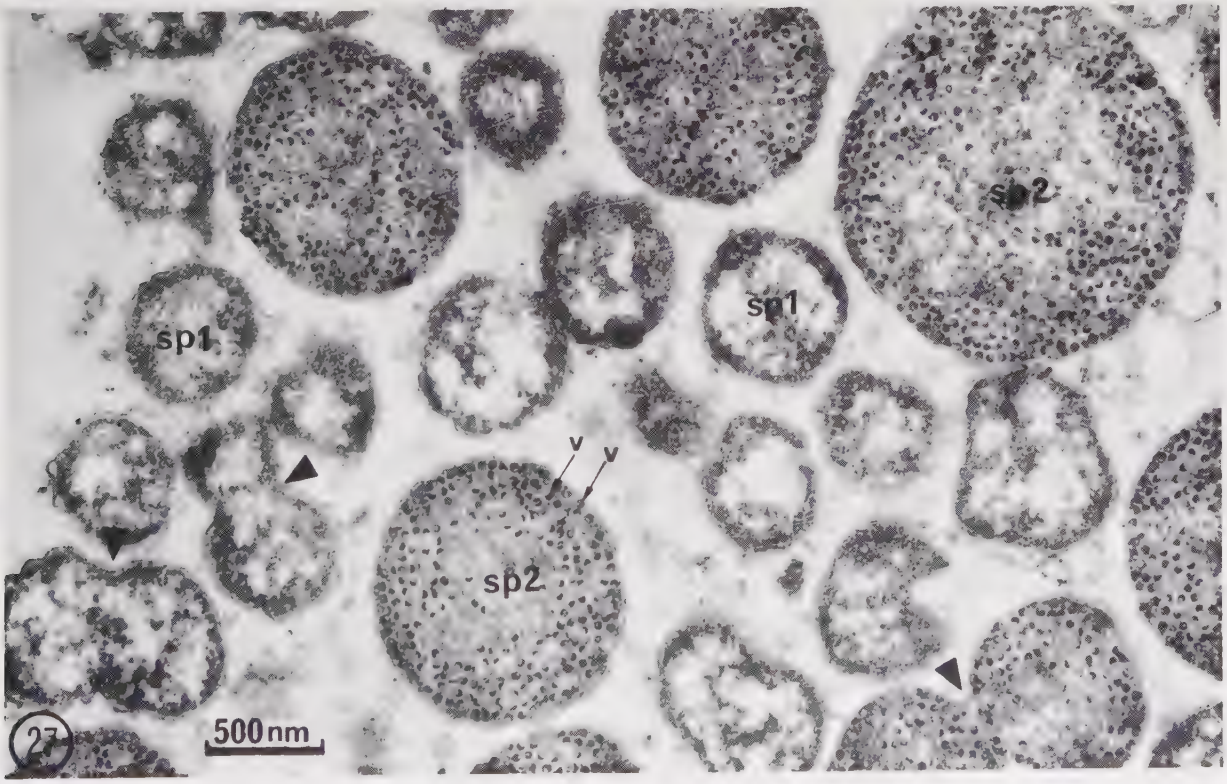
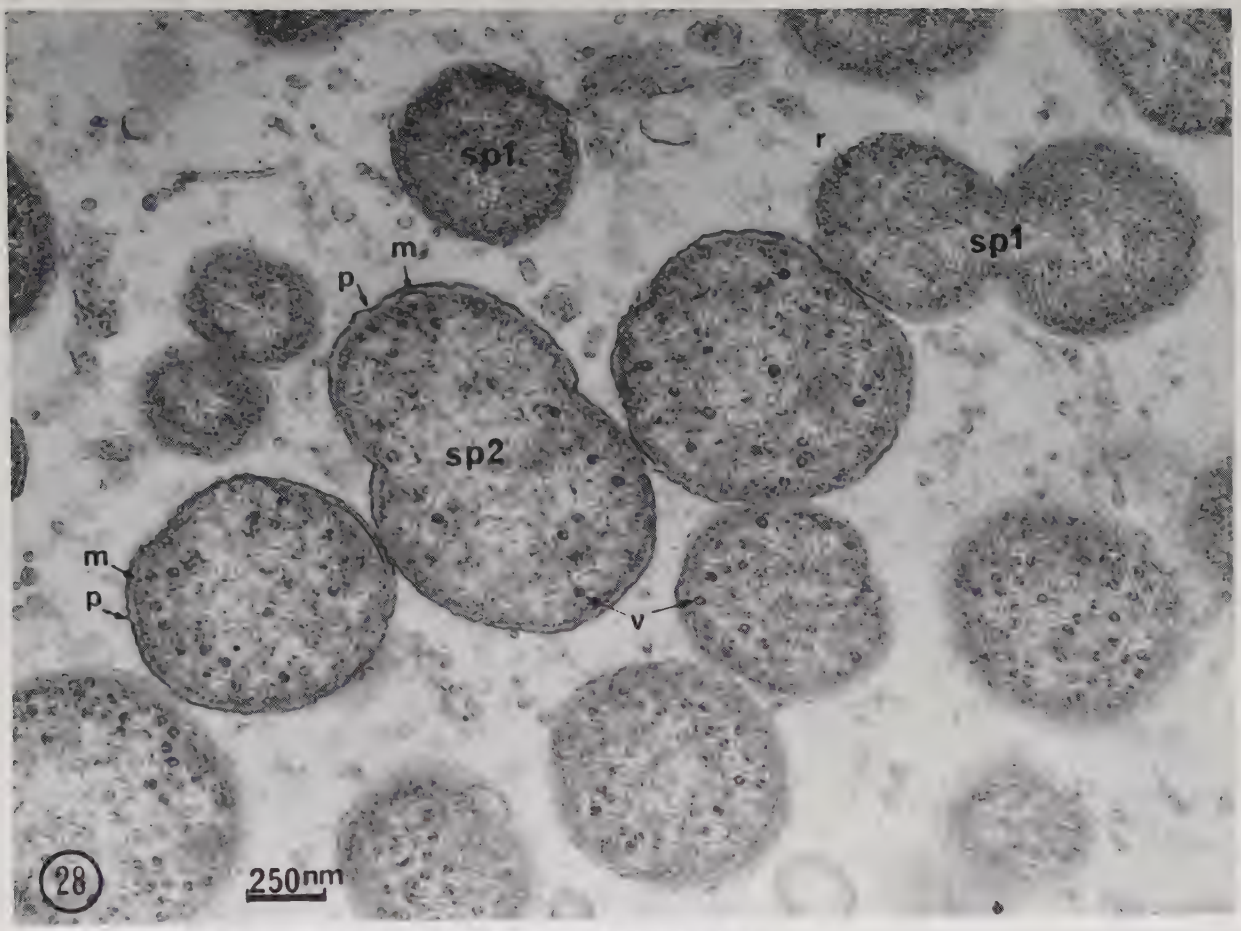

sp1
sp1
sp2
v
v
sp2
27
500nm

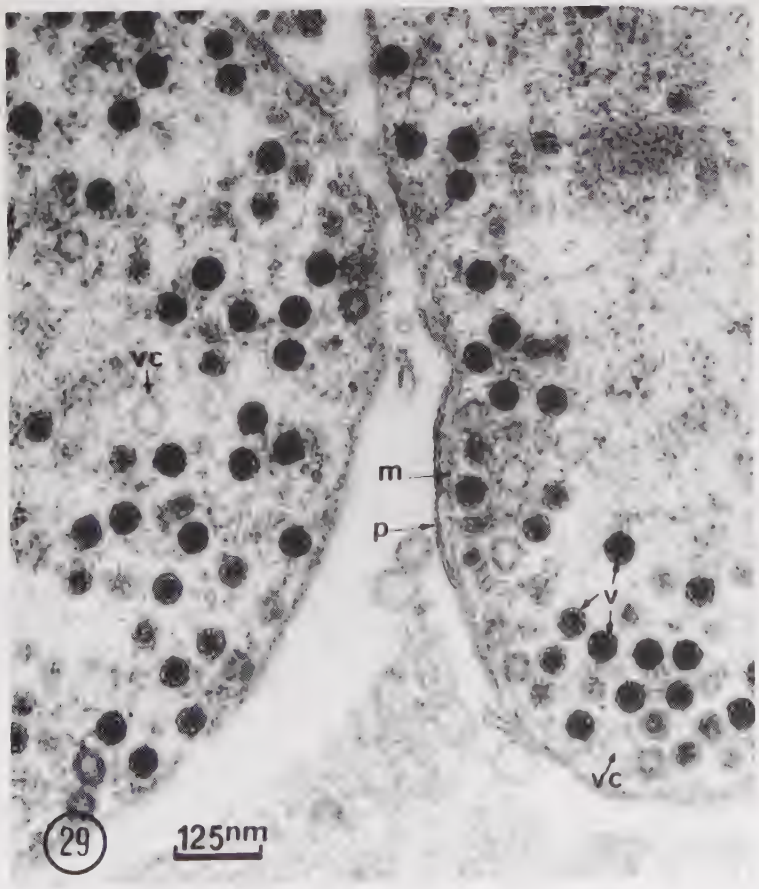
PLANCHE XI

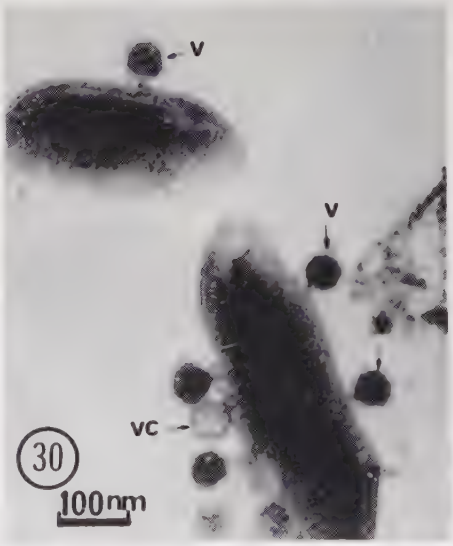
Rickettsiose de *Buthus occitanus*
Phage de *Porochlamydia buthi*.
Ultrastructure.

Fig. 28 et 29. : La nature microbienne des sphérules (sp1 et sp2) est attestée par la présence d'une paroi (p) et d'une membrane cytoplasmique (m) comparables à celles des corps initiaux de *Porochlamydia buthi*. Les virus (v) apparaissent tout d'abord à la périphérie des sphérules. vc : particules virales vides, r : ribosomes, fig. 28 X 39000, fig. 29 X 88000.

Fig. 30 et 31. : Dans les vacuoles de phagocytose , situées dans les hemocytes de la glande lymphoïde, on note la fixation des phages (v) sur les corps élémentaires (ce) de *Porochlamydia buthi*. Cette fixation se fait par l'intermédiaire de la queue (q) et des crampons (c) du phage. vc : particule creuse. Fig. 30 X 98000, fig. 31 X 240000.


sp1
r
sp1
m
p
sp2
m
p
v
28
250nm


vc
m
p
v
vc
29
125nm


v
v
vc
30
100nm

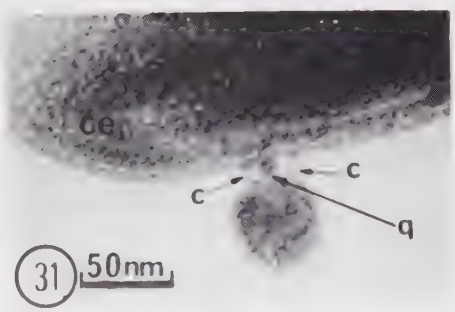
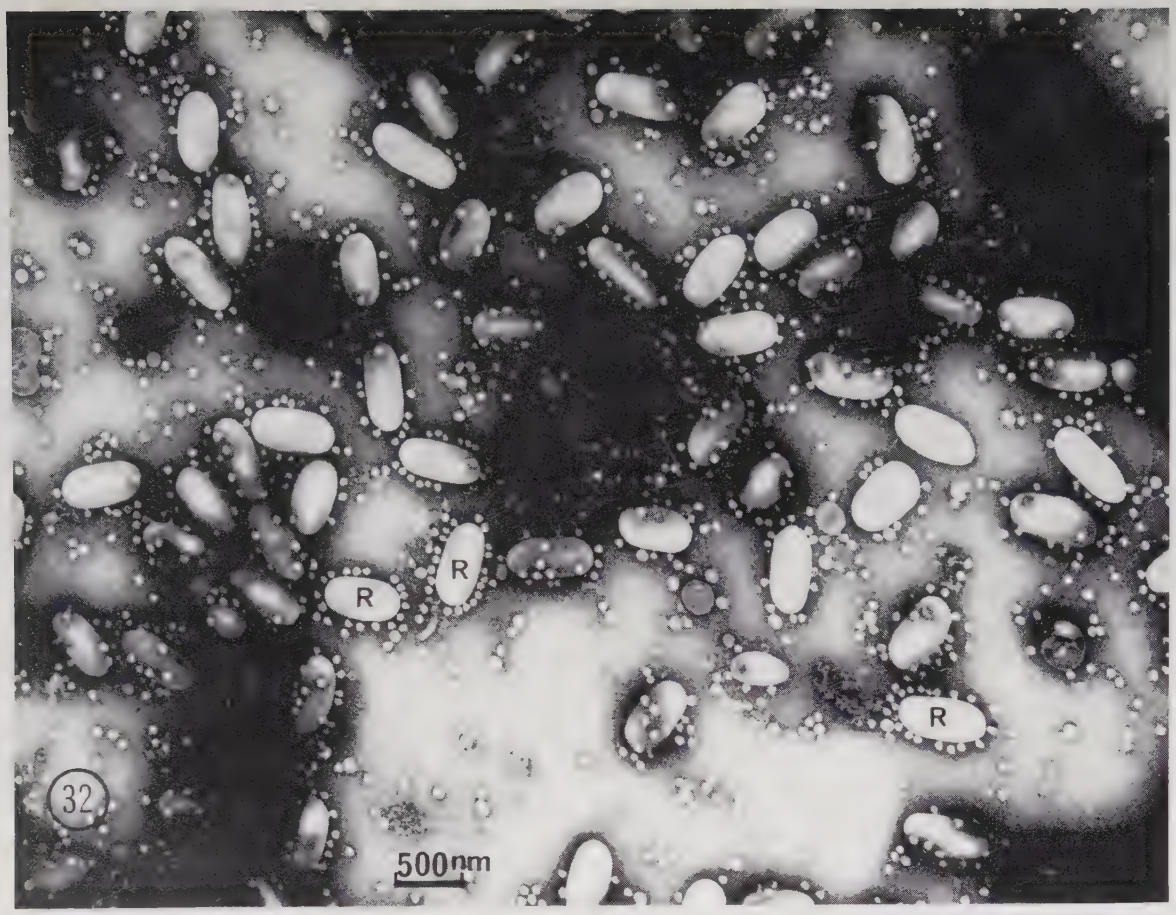

ce
c
c
q
31
50nm

PLANCHE XII

Rickettsiose de *Buthus occitanus*
Phage de *Porochlamydia buthi*.
Ultrastructure.

Fig. 32. : Préparation partiellement purifiée de corps élémentaires (R) de *Porochlamydia buthi* provenant d'un scorpion où le phage se développe. Les virus sont fixés en grand nombre sur les microorganismes. Coloration négative au phosphotungstate de sodium neutre. X 18500.

Fig. 33. : Section d'un corps élémentaire de *P. buthi* sur lequel sont fixés de nombreux phages. X 190000.


R
R
R
32
500nm

33
100 nm

PLANCHE XIII

.Rickettsiose de *Buthus occitanus*.
Phage de *Porochlamydia buthi*.
Ultrastructure.

Fig. 34. : Phages contrastés négativement par le phosphotungstate de sodium neutre. L'observation des suspensions virales peu purifiées permet de noter l'existence d'une queue courte (q) entourée de crampon (c). La forme des virus n'est pas toujours définie. Les particules montrant une symétrie de type 2 (●) et de type 5 (▲) sont cependant reconnaissables. X 10000.

Fig. 35 a-b : Particules virales colorées par l'acétate d'uranyle en pH acide. La pénétration du colorant dans les particules permet l'observation de sous unitésau niveau de la capside (→). q : queue. X 110000.

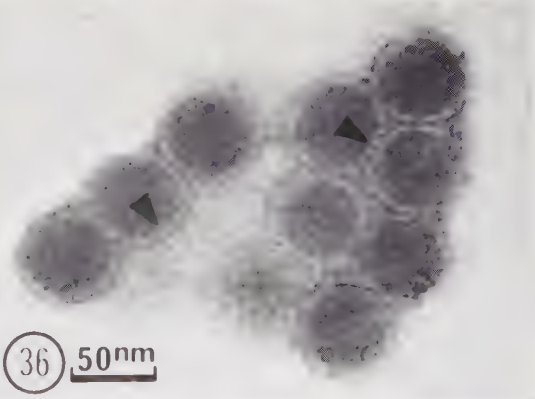
Fig. 36. : Section d'un culot de virus. Des sous unités sont visibles au niveau de la capside (►). X 225000.

Fig. 37 a-f : Particules virales provenant de matériel pur. Les trois types de symétrie caractérisant un volume icosaedrique peuvent être observés. Symétrie de type 3: fig. 37a et 37b, symétrie de type 5: fig. 37c et 37a, symétrie de type 2: fig. 37e et 37f. X 225000.

34 100nm

35 a 100nm

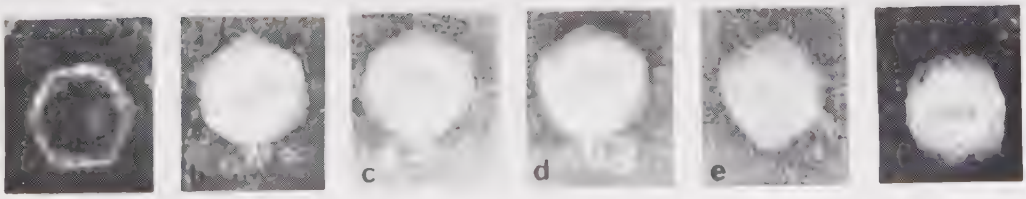
35 b 100nm



36 50nm

37 a → f

50nm



CHAPITRE VI

ETUDE DES RICKETTSIOSES DE L'ARAIGNEE *PISAURA MIRABILIS* Cl.

Plusieurs microorganismes de type rickettsiens ont été isolés chez l'araignée *Pisaura mirabilis* à partir d'individus capturés dans diverses stations du Languedoc.

Le premier appartient au genre *Rickettsiella ;* il a été isolé (Morel, 1977) au cours de l'étude d'un animal présentant, malgré l'inoculation d'ecdystérone, une absence de mue au cours des 80 jours précédant sa mort ; chez les animaux sains, les mues ont lieu environ tous les 40 jours (Bonaric, 1977).

Deux autres microorganismes ont été isolés ultérieurement (Morel, 1978). Appartenant au genre *Porochlamydia*, ils ont été trouvés accidentellement au cours de la détermination de la fréquence d'une maladie virale (Morel et coll., 1978) dans les populations de cette araignée.

Nous allons étudier successivement ces trois rickettsioses causées respectivement par les rickettsies : *Rickettsiella sp., Porochlamydia buthi ssp. pisauri* et *Porochlamydia piriformis*. Du fait de la présence de ces trois microorganismes chez la même araignée, nous en parlerons dès à présent sous leur nom de genre ou d'espèce pour rendre le texte plus compréhensible bien que la position systématique de ces microorganismes ne soit discutée qu'à la fin de l'étude de chacune des maladies.

I - ETUDE DE LA RICKETTSIOSE A *RICKETTSIELLA SP.*

La souche de ce microorganisme ne provient que d'un seul individu. Multiplié par des infections expérimentales, il n'a jamais pu être

isolé à nouveau chez des individus capturés dans la station d'origine ou dans d'autres stations.

1 - Pathogénie.

Les infections expérimentales donnent des résultats très différents selon le mode d'infection utilisé. Si les infections par inoculation permettent de reproduire la maladie chez la totalité des animaux infectés qui survivent au processus opératoire, les infections par voie buccale, plus proches de ce qui serait le type d'infection naturelle, ne conduisent à la multiplication du germe que chez 5 à 10 % au maximum des individus.

Après inoculation la maladie évolue assez rapidement ; les microorganismes sont retrouvés dans les déjections à la fin de la 3ème semaine qui suit la contamination. La maladie dure souvent plusieurs mois au cours desquels les animaux ne muent plus. La mort survient à partir du troisième mois d'infection.

2 - Histopathologie.

Les germes se développent dans un grand nombre de tissus de l'hôte. Ils y constituent des colonies pouvant atteindre une assez grande taille (20 à 30 µm) et se colorant fortement par les colorants basiques tels le bleu de toluidine et la thionine (Pl. XIV, fig. 38). La coloration de gram sur coupe (technique de Weigert (Humason, 1962)) est interprétée comme positive pour la région centrale des microcolonies ; bien que la coloration soit bleu pâle et non bleu foncé comme le sont les bactéries gram + que l'on rencontre parfois dans le tube digestif. Cette coloration contraste avec la couleur rose des microcolonies de *Porochlamydia* qui sont nettement gram-négatif. Sur les frottis, après coloration de gram, les grandes formes (formes végétatives) sont gram-négatif ; le gram des corps élémentaires ne peut être déterminé en raison de leur taille trop faible.

Les tissus infectés sont, par ordre d'importance décroissante, le tissu digestif (cellules absorbantes et cellules à ferment), le tissu interstitiel, l'hypoderme, les glandes à venin, les tubes de Malpighi, les glandes séricigènes et les glandes salivaires. Le nombre des cellules infectées dans les trois derniers tissus est très faible (1 cellule environ par coupe).

Quantitativement et qualitativement, les microcolonies diffèrent profondément dans tous ces tissus. Le tissu digestif est le site de développement privilégié : les microcolonies y sont de grande taille (25 µm de moyenne), composées de très nombreuses particules bien colorées, à la limite de la visibilité en microscopie optique (Pl. XIV, Fig. 38, 41). Elles renferment de plus parfois quelques particules sphériques faiblement eosinophiles de 2 à 2,5 µm de diamètre. Deux zones peuvent être distinguées dans ces microcolonies, d'une part une zone périphérique formée de particules d'assez grande taille et très colorées par le bleu de toluidine, d'autre part une zone centrale où les particules de petite taille sont plus faiblement colorées. Ces microcolonies envahissent la totalité des cellules de l'hépatopancréas et leur contenu se retrouve également fréquemment dans la lumière des diverticules digestifs. Ce type de microcolonie, composée à peu près uniquement de particules de petite taille, existe dans les cellules de l'hypoderme, celles des glandes à venin, des glandes salivaires et des glandes séricigènes.

En revanche, les cellules du tissu interstitiel et des tubes de Malpighi renferment de petites microcolonies de 5 à 7 µm de diamètre qui apparaissent composées essentiellement de particules sphériques de grande taille. Ces particules non colorées par les colorants basiques se colorent bien après coloration de gram (elles sont gram-négatif), et après coloration à l'azocarmin-aniline (Azan de Heidenhain) (Pl. XIV, Fig. 39). Elles apparaissent alors soit comme des sphères soit comme des calottes plus ou moins développées. La tétrazoréaction de Danielli met en évidence la nature protéinique de leur contenu.

Les cellules sanguines ne sont le siège d'aucun développement du microorganisme ; elles renferment souvent des vacuoles ce qui suggère l'existence d'un phénomène de phagocytose.

L'observation des coupes semi-fines provenant du matériel fixé pour la microscopie électronique permet de mieux différencier les deux types de particules observables en microscopie optique (Pl. XIV, Fig. 40, 41). Les particules de petite taille apparaissent cocoïdes, les particules de grande taille sont sphériques et possèdent un matériel fortement colorable en forme de croissant plus ou moins plein. Les coupes semi-fines révèlent leur fréquence différente par rapport aux particules de petite taille selon les cellules hôtes. Rares dans les grandes vacuoles de développement, elles deviennent proportionnellement plus nombreuses dans les vacuoles de petite taille rencontrées dans le tissu interstitiel ainsi que dans certaines cellules du tissu digestif comme les cellules riches en cristaux de guanine et en substance de déchet.

3 - Microscopie électronique.

L'étude en microscopie électronique des coupes fines d'hépatopancréas révèle la présence du microorganisme sous quatre formes distinctes à l'intérieur de vacuoles intracytoplasmiques (Pl. XV, Fig. 42). Trois d'entre elles, assimilables aux formes de petite taille observées en microscopie optique, correspondent aux corps initiaux, corps élementaires et corps intermédiaires d'un cycle de type chlamydien. La 4ème correspondant aux grandes formes sphériques, représente des formes ricketsiennes géantes.

a) - *Vacuoles de développement et cycle*.

Les microorganismes sont toujours observés dans des vacuoles intracytoplasmiques : les plus jeunes microcolonies ne renferment que des formes végétatives (corps initiaux) (Pl. XVI, Fig. 43). La multiplication de ces formes végétatives entraîne un accroissement de la taille des microcolonies et on note simultanément l'apparition des autres stades du cycle : les corps intermédiaires puis les formes de résistance (corps élémentaires) (Pl. XVI, Fig. 45). La maturation des microorganismes se fait à partir de la zone centrale des vacuoles (Pl. XVII, Fig. 46) ; la périphérie est principalement occupée par les formes végétatives et tout en fin de cycle par les corps intermédiaires.

A la fin du développement les microcolonies sont constituées de corps élémentaires (Pl. XVII, Fig. 47) auxquels s'associent parfois quelques corps géants. Ces derniers lorsqu'ils apparaissent dans les microcolonies, le font tout au long du cycle du microorganisme (Pl. XV, Fig. 42 ; Pl. XIX, Fig. 52 ; Pl. XX, Fig. 54,55).

b) Les corps initiaux. (Pl. XVI).

Les corps initiaux sont bacilliformes et de grande taille. Si leur diamètre varie de 470 à 670 nm, leur longueur plus difficile à estimer atteint jusqu'à 2 µm et est vraisemblablement plus importante. Le flou des limites de ces corps à leurs extrémités permet en effet de supposer que ces particules se prolongent en dehors des plans de coupe (Pl. XVI, Fig. 43). Très clairs aux électrons ils renferment un cytoplasme granuleux et un ou plusieurs nucléoïdes centraux peu marqués (Pl. XVI, Fig. 43,44) au sein d'un réseau de fibrilles. Ils sont limités par deux doubles membranes nettement séparées par un espace périplasmique de 50 à 100 Å. La paroi de 70 Å d'épaisseur est bien visible, parfois légèrement plissée. La membrane cytoplasmique plus difficile à distinguer (Pl. XVI, Fig. 44) reste généralement accolée au cytoplasme. Peu de figures de divisions nettes sont visibles à ce stade du cycle.

c) Les corps élémentaires. (Pl. XVII, XVIII).

Etudiés à partir de suspensions contrastées négativement, les corps élémentaires se présentent sous la forme d'ovoïdes de 510 nm de long sur 250 nm de large en moyenne (Pl. XVIII, Fig. 48). Leurs extrémités sont légèrement pointues. Leur surface est irrégulièrement colorée ce qui traduit à notre avis des déformations au niveau de la paroi des particules ; le phosphotungstate de sodium se dépose dans les zones creuses ou plissées de leur surface. Un certain nombre de particules partiellement vidées de leur contenu sont trouvées dans ces préparations. D'une forme ovoïde plus régulière, on n'y distingue que la paroi et une structure interne plissée que nous assimilons à la membrane cytoplasmique. Cette observation met en évidence l'absence de solidarité existant entre ces deux structures.

Sur les coupes fines, les sections de corps élémentaires ont soit l'aspect de cercles soit celui de bâtonnets denses aux électrons, ce qui correspond à des coupes de particules bacilliformes (Pl. XVII, Fig. 47 Pl. XVIII, Fig. 49). Les corps mesurent sur coupes 500 à 540 nm de long pour un diamètre de 170 nm ; la comparaison de tailles avec celles mesurées sur les particules contrastées négativement, montre l'aplatissement important des particules résultant du type de préparation conduisant aux colorations négatives et donc leur faible rigidité.

Les limites cellulaires ont un aspect pentalaminaire dû à la densification importante de l'espace périplasmique entre le feuillet interne de la paroi et le feuillet externe de la membrane cytoplasmique. Le feuillet interne de celle-ci est par ailleurs très difficile à distinguer en raison de la densification importante subie par le cytoplasme. L'ensemble paroi-membrane a une épaisseur de 240 nm, les feuillets denses et clairs individualisés ayant chacun 35 nm d'épaisseur. L'ensemble composé par l'espace périplasmique et les deux feuillets denses qui s'y accolent mesure 100 nm. Le cytoplasme des corps élémentaires est dense aux électrons ; il entoure un nucléoïde allongé, légèrement excentré de section plus ou moins polygonale (Pl. XVIII, Fig. 49) et renferme des granules assimilables à des ribosomes. Certaines vacuoles, ne renfermant le plus souvent que des corps élémentaires, sont situées dans la région apicale des cellules. La proximité de la lumière du diverticule dont les vacuoles ne sont séparées que par une mince couche cytoplasmique permet de penser que les formes de résistance vont être libérées par ouverture de la vacuole sans qu'il y ait lyse de la cellule (Pl. XVII , Fig. 47).

d) Les corps intermédiaires. (Pl. XVIII).

Ces corps qui font la transition entre les corps initiaux et les corps élémentaires montrent tous les stades de passage entre ces deux types de particules. En dehors d'une diminution de taille par rapport à celle des corps initiaux, ils sont surtout caractérisés par une condensation du matériel nucléaire. Le nucléoïde se différencie nettement au sein d'un réseau de fibrilles bien marqué (Pl. XV, Fig. 42 ; Pl. XVI, Fig. 45). La condensation du cytoplasme s'accompa-

gne de sa densification progressive. Les limites cellulaires évoluent simultanément : d'abord plissées, sans doute en raison de la diminution de volume du cytoplasme, elles évoluent ensuite vers la limite cellulaire des corps élémentaires par réduction de l'espace périplasmique et densification de ce dernier (Pl. XVIII, Fig. 50,51). C'est au stade des corps intermédiaires que les figures de division sont les plus fréquentes. Il semble donc y avoir séparation dans le temps entre la multiplication et la division chez ce type de microorganisme. Ces divisions tardives conduisent, à notre avis, à la formation de "chaînettes" signalée par de nombreux auteurs dont Huger et Krieg (1967) chez le genre *Rickettsiella*. La maturation des microorganismes ne se fait pas d'une manière synchrone au sein d'une même vacuole ; elle est centrifuge (PL. XVII , Fig. 46). Les éléments les plus âgés (corps élémentaires) occupent la zone centrale tandis que les formes jeunes (corps intermédiaires et corps initiaux) sont dans la région périphérique des vacuoles.

e) Les corps géants. (Pl. XX).

Les corps géants sont parasphériques et mesurent jusqu'à 2,5 µm de diamètre. Ils semblent dériver des corps initiaux. Ils montrent dans un premier temps un cytoplasme granulaire qui renferme un ou plusieurs nucléoïdes peu marqués et une ou deux régions très claires aux électrons (PL. XV, Fig.42 ; Pl. XIX, Fig. 52 ; Pl. XX, Fig. 53). Une opacification progressive au sein du cytoplasme est ensuite notée (Pl. XX, Fig. 54,55). Cette opacification correspond à l'accumulation d'un matériel amorphe devenant de plus en plus opaque aux électrons au cours de la maturation des corps géants. L'accroissement de ce dépôt repousse le cytoplasme granuleux à la périphérie des particules, le cytoplasme disparaît ensuite presque totalement chez les formes en fin d'évolution. Un léger réseau cristallin est décelable dans quelques cas, sa structure périodique a une maille de 8 nm (Pl. XX, Fig. 56). Des structures membranaires peuvent être observées dans certains corps géants (Pl. XX, Fig. 57). Les zones claires aux électrons subsistent toujours conférant la forme en croissant caractéristique notée pour ces particules en microscopie optique. Ce type de particule se rencontre avec une fréquence différente selon les vacuoles de développement observées. Deux types de vacuoles sont rencontrées : des vacuoles de grande taille riches en corps

élémentaires en fin d'évolution qui renferment peu ou aucun corps géants (Pl. XVI, Fig. 45 ; Pl. XVII, Fig. 46) et des vacuoles de petite taille chez lesquelles le nombre de corps élémentaires formés est faible et où, en revanche, les corps géants sont proportionnellement très nombreux (Pl. XX, Fig. 54, 55). Ces vacuoles se rencontrent dans des types cellulaires différents : les vacuoles de grande taille dans les cellules absorbantes des diverticules digestifs, les vacuoles à corps géants dans les cellules du tissu interstitiel ainsi que dans les cellules des diverticules digestifs qui renferment de très nombreux cristaux de guanine, certaines cellules à ferment et les cellules riches en déchets (Pl. XIV, Fig. 40, 41 ; ; Pl. XXI, Fig. 58).

4 - Position systématique.

Ce microorganisme possède un cycle superposable en tout point à celui des *Rickettsiella* décrit par Devauchelle et coll. (1972) et les caractères ultrastructuraux de ses corps élémentaires, corps initiaux et corps intermédiaires, sont comparables à ceux des *Rickettsiella* les mieux connues comme *R. melolonthae* (Devauchelle et coll., 1971) ou *R. armadillidii* (Vago et coll., 1970 ; Yousfi , 1976).

Il se singularise cependant par la structure du matériel contenu dans les corps géants et par la fréquence de ces derniers dans les différents types cellulaires.

Chez les autres *Rickettsiella*, l'accumulation d'une substance de nature protéique conduit soit à l'apparition de grandes formations cristallines comme chez *R. popilliae*, *R. melolonthae*, *R. cetonidarum* et *R. tipulae*, soit à celle de petites formations disséminées comme chez *R. grylli*, *R. armadillidii* et la *Rickettsiella* de l'araignée *Argyrodes gibbosus*. Ces deux types de structures correspondent à deux groupes sérologiques distincts et sont utilisés par Croizier (1976) pour regrouper les diverses *Rickettsiella* en deux espèces : *R. popilliae* et *R. grylli*.

En raison du caractère particulier des corps géants qui ne constituent pas un stade du cycle des microorganismes et dont nous par-

lerons dans le chapitre VI, nous considérons le microorganisme qui vient d'être décrit comme appartenant au genre *Rickettsiella* mais sans le rattacher à une espèce déjà connue ni créer une nouvelle espèce. Les caractères utilisables pour la systématique du genre sont à notre avis insuffisants pour pouvoir différencier les diverses espèces et sous-espèces le composant et la spécificité d'hôte est trop faible pour pouvoir lier un germe à un hôte déterminé. C'est pourquoi, en attendant la mise en évidence de critères spécifiques dans ce genre, nous utiliserons pour la *Rickettsiella* isolée chez l'araignée *Pisaura mirabilis* le terme de *Rickettsiella sp.*

II- ETUDE DES RICKETTSIOSES A *POROCHLAMYDIA*.

En étudiant au microscope électronique les suspensions réalisées à partir des déjections de plusieurs dizaines d'araignées afin de connaître la proportion des individus naturellement porteurs d'un virus (Morel et coll., 1978) ; nous avons observé, chez une forte proportion d'animaux (10 à 15 %), des particules d'allure rickettsienne.

Les études en microscopie électronique des animaux infectés naturellement ou expérimentalement ont permis de différencier aisément deux microorganismes voisins qui appartiennent au genre *Porochlamydia*. Avant d'étudier chacun deux séparément, nous allons donner les résultats obtenus après infection expérimentale, ces résultats étant identiques pour les deux *Porochlamydia*.

Pathogénie.

La multiplication des microorganismes fait suite soit à l'ingestion soit à l'inoculation dans l'hémocoele des formes de résistance obtenues par centrifugations différentielles. Le dernier mode de contamination a été peu utilisé en raison de la forte mortalité post-opératoire qui suit l'inoculation. La multiplication des microorganismes que l'on peut constater par les études histopathologiques se traduit exté-

rieurement, uniquement par la dissémination des formes de résistance des microorganismes au bout d'une vingtaine de jours environ. La multiplication de ces microorganismes n'entraîne aucune modification dans le comportement des animaux infectés et ne diminue pas leur durée de vie.

Infectés à un stade jeune (stade 5 ou 6), déterminé d'après des barèmes trichobothriotaxiques (Emerit et Bonaric, 1975 ; Bonaric, 1975), les araignées montrent une croissance normale, muent à des intervalles de temps identiques à ceux notés pour les animaux sains et atteignent le stade adulte. Les femelles pondent et les mâles ont un comportement prénuptial normal. Les pontes sont stériles, les animaux étant élevés individuellement; aussi nous a t-il été impossible de voir s'il y avait un passage transovarien des microorganismes.

Ces deux rickettsioses se caractérisent donc par une absence d'action pathogène du moins dans les conditions expérimentales ce qui contraste avec les deux maladies étudiées précédemment chez le scorpion et chez la même araignée.

A - Histopathologie et étude en microscopie électronique de la rickettsiose à *Porochlamydia buthi ssp. pisauri*.

1 - Histopathologie.

Les cellules infectées se rencontrent exclusivement dans l'appareil digestif. Toutes les cellules de l'intestin moyen sont atteintes qu'elles soient situées dans les diverticules céphalothoraciques ou abdominaux. Les cellules absorbantes et les cellules à ferments sont également sensibles. Les noyaux apparaissent identiques à ceux des animaux sains. De 6 à 10 µm de diamètre, ils ont un nucléole de petite taille (1,5 µm de diamètre) et leur chromatine est disposée en amas le long de la membrane nucléaire.

Dans les cellules absorbantes, deux types de microcolonies se développent. Les cellules renferment soit une seule microcolonie de grande taille (25 µm de diamètre), soit de très nombreuses micro-

colonies grossièrement sphériques (de 5 µm de diamètre en moyenne) très colorables (Pl. XXII, Fig. 59). Ce deuxième type de développement est le plus fréquent, il contraste avec celui à microcolonie unique ou peu nombreuses qui caractérisait *P. buthi buthi*. Un certain nombre de cellules étant intactes à côté des cellules infectées (Pl. XXII, Fig. 61), nous pensons pouvoir rejeter l'hypothèse d'une surinfection initiale des cellules digestives et suggérons que dans le cas de cette rickettsie peut exister une autoinfection des cellules hôtes. La première microcolonie, se développant, libére dans la cellule des formes infectieuses qui donneraient naissance aux multiples microcolonies. Ces microcolonies présentent généralement un aspect granulaire, mais dans certains cas elles apparaissent rayées (Pl. XXII, Fig. 62). Lorsqu'elles sont libérées dans la lumière des diverticules ou dans l'hémolymphe, elles gardent le même aspect ce qui montre leur grande cohésion. Sur frottis d'hémolymphe, comme sur coupes semi-fines, les vacuoles montrent très souvent des zébrures qui correspondent, d'après les observations au microscope électronique, à des alignements parallèles de particules.

Les cellules à ferment ne renferment généralement pas de microcolonies mais des particules basophiles dispersées dans l'ensemble du cytoplasme (Pl. XXII, Fig. 60). De plus grande taille que celles renfermées dans les vacuoles, ces particules correspondent à des formes abérrantes d'après les coupes fines ; nous les considérons comme équivalentes, jusqu'à un certain point, à des corps géants.

2 - Microscopie électronique.

Les coupes ultrafines de l'hépatopancréas des araignées infectées montrent le développement intracellulaire du microorganisme. Les microcolonies sont généralement contenues dans des vacuoles intracytoplasmiques. Elles sont le plus souvent constituées de particules (Pl. XXIII, Fig. 63) rappelant celles observées au cours de la rickettsiose à *P. buthi buthi* du scorpion *B. occitanus*. Dans quelques cas cependant les formes que l'on y observe, traduisent un développement anormal du microorganisme (Pl. XXVIII, Fig. 79).

a) Vacuoles de développement et cycle.

Le microorganisme se développe à l'intérieur de vacuoles intractytoplasmiques, de formes régulières, généralement sphériques (Pl. XXIV, Fig. 64 ; Pl. XXVI, Fig. 72). Au début du cycle, les microcolonies ne renferment que des corps initiaux au contact les uns des autres (Pl. XXIV, Fig. 64). La transformation de ces formes végétatives en formes de résistances semble se faire de manière à peu près synchrone pour tous les microorganismes d'une microcolonie (Pl. XXIII, Fig. 63). En fin de cycle, les vacuoles de développement, bourrées de corps élémentaires conservent leur intégrité ; les particules y sont en contact les unes avec les autres ce qui se traduit par leur arrangement très régulier (Pl. XXVI, Fig. 72).

Les trois formes observées indiquent donc l'existence d'un cycle identique à celui de *P. buthi buthi*. Dans certaines cellules (Pl. XXVIII, Fig. 79), les vacuoles de développement sont de petite taille et ne renferment qu'un très faible nombre de microorganismes. On y observe que deux catégories de particules qui ne correspondent pas à celles apparaissant normalement au cours du cycle.

Bien que la plupart des microcolonies restent limitées par le tonoplasme, certaines d'entre elles sont en contact direct, plus ou moins important, avec le hyaloplasme à la suite de la rupture de la membrane de la vacuole. L'apparition de particules de glycogène au sein des microcolonies (Pl. XXIV, Fig. 66) traduit dans certains cas la pénétration dans la vacuole lésée de matériel d'origine cellulaire. Ces lésions des vacuoles de développement s'accompagnent de modifications morphologiques et ultrastructurales chez les microorganismes qui apportent des précisions sur leur forme et leur structure interne (Pl. XXIV, Fig. 65,66,67 ; Pl. XXV, Fig. 69).

b) Les corps initiaux. (Pl. XXIV).

Ils possèdent comme ceux de *P. buthi buthi* un cytoplasme clair aux électrons où sont visibles des ribosomes et un réseau lâche de fibrilles (Pl. XXIV, Fig. 65). Il semble également exister dans

leur cytoplasme un système membranaire assimilable à un mésosome. Ces corps initiaux se caractérisent par un pléomorphisme important. Parfois sphériques, ils ont le plus souvent une forme irrégulière (Pl. XXIV, Fig. 64,65). L'absence de régularité dans les formes observées est vraisemblablement due à la grande densité de microorganismes au sein de vacuoles peu élastiques. Les microorganismes sont tassés les uns contre les autres alors que chez *P. buthi buthi*, ils disposent d'un espace plus important. On retrouve donc dans les vacuoles jeunes la compacité notée en microscopie optique pour les vacuoles âgées renfermant les formes de résistances.

Les corps initiaux trouvés dans des vacuoles altérées ont une forme sphérique parfois très régulière (Pl. XXIV, Fig. 65) comparable à celle notée pour *P. buthi buthi*. Cette forme traduit la plasticité des limites cellulaires des particules et suggère donc que la forme des corps initiaux n'est pas un caractère fixe du microorganisme mais est fonction des conditions de pression osmotique et de l'encombrement spatial existant au sein des microcolonies.

Dans certaines microcolonies, les altérations du milieu intravacuolaire sont très importantes. La présence de granules de glycogène suggère que ces modifications sont consécutives à la pénétration dans les vacuoles de matériel d'origine cellulaire (Pl. XXIV, Fig. 66). Dans de telles conditions, les corps initiaux montrent un gonflement important qui se traduit par une augmentation de l'espace périplasmique. Le système membranaire interne devient alors nettement visible ; il est en continuité avec la membrane plasmique (Pl. XXIV, Fig. 66,67) et est assimilable à un mésosome.

La taille de ces particules varie de 400 à 500 nm de diamètre pour les corps initiaux sphériques et de 600 nm à 800 nm de long sur 400 nm de diamètre pour les bacilliformes et est donc comparable à celle de *P. buthi buthi*.

Les divisions se font principalement à ce stade (Pl. XXIII, Fig. 63 ; Pl. XXIV, Fig. 65) ; elles peuvent cependant se produire au cours des premiers stades intermédiaires.

c) Les corps élémentaires.

(Pl. XXV, Fig. 71 ; Pl. XXVI et Pl. XXVII).

Les formes de résistance du microorganisme (corps élémentaires) obtenues par centrifugation différentielle et contrastées négativement par l'acide phosphotungstique se présentent au microscope électronique sous le même aspect que ceux de *P. buthi buthi* (Pl. XXV, Fig. 71). Leur taille est cependant légèrement plus faible que chez le microorganisme du scorpion : 560 ± 60 nm de long sur 240 ± 15 nm de large.

Sur coupe ultrafine, les corps élémentaires du microorganisme sont également morphologiquement et ultrastructuralement identiques à ceux de *P. buthi buthi* ; en forme d'ovoïdes aplatis (Pl. XXVI, Fig. 72), ils ont un nucléoïde périphérique (Pl.XXVI, Fig. 73) entourant le cytoplasme où sont régulièrement alignés les ribosomes (Pl. XXVI, Fig. 74). La seule différence se situe au niveau du système membranaire interne qui est plus développé que chez *P. buthi buthi*. La microscopie électronique permet de constater une disposition beaucoup plus régulière des corps élémentaires à l'intérieur des vacuoles. Particulièrement nets dans les petites vacuoles (Pl. XXVI, Fig. 72), les empilements parallèles de particules confèrent aux microcolonies l'aspect rayé décelé en microscopie optique (Pl. XXII, Fig. 62).

La richesse en particules des vacuoles nous a permis d'utiliser une platine goniométrique. Grâce à la possibilité de faire varier l'angle formé par le faisceau d'électrons et le plan des coupes, ces observations permettent de vérifier la forme des particules en les observant sous plusieurs angles et d'apporter de nouveaux éléments quant à la structure fine de la paroi de ce genre de microorganisme.

Il est ainsi possible d'obtenir plusieurs vues d'un même groupe de microorganismes. Pour chacune de ces vues les particules nettes sont différentes et la forme de chaque particule varie en fonction de son orientation par rapport au faisceau d'électrons (Pl. XXVII, Fig. 78). Simultanément, la structure striée de la paroi apparaît pour un certain nombre de particules (Pl. XXVII). Avec une platine normale

la paroi apparaît striée seulement pour de rares corps élémentaires (Pl. XXVI, Fig. 75). Si l'on fait l'hypothèse que la paroi est constituée de sous-unités régulièrement alignées tout autout des particules, elles ne seront visibles que dans de très rares cas c'est-à-dire uniquement quand les particules de plusieurs rangs successifs sont alignés selon une direction parallèle à celle du faisceau d'électrons. Les modifications dans l'orientation de la coupe permettent d'obtenir pour tous les corps élémentaires l'apparition à un certain moment de la structure striée (Pl. XXVII, Fig. 76,77). Cette structure étant observée pour les particules coupées selon des plans voisins de leurs trois plans de symétrie, on peut la considérer comme résultant vraisemblablement de l'existence de sous-unités au niveau de la paroi.

d) Les corps intermédiaires. (Pl. XXV).

La transformation des corps initiaux en corps élémentaires se fait de la même manière que chez *P. buthi buthi*. La différence morphologique existant au début du cycle se traduit par le même type de variation chez les corps intermédiaires. Ceux-ci vont passer par un stade montrant des coupes en forme de croissant très caractéristique (Pl. XXIII , Fig. 62 ; Pl. XXV, Fig. 68), la densification commence à l'une des pointes et gagne progressivement la totalité de la particule. Lors de la rupture des vacuoles, les corps intermédiaires sont plus sphériques ; ils ont une forme très proche de celle notée chez la rickettsie du scorpion (Pl. XXV, Fig. 69). La réduction de l'espace périplasmique est accompagnée en fin de cycle de l'expulsion du matériel renfermé entre la paroi et la membrane cytoplasmique (Pl. XXV, Fig.70). Ce matériel reste enfermé dans les vésicules limitées par une double membrane qui se forme par bourgeonnement au niveau de la paroi non restructurée des corps intermédiaires.

e) Les formes aberrantes. (Pl. XXVIII).

Les microorganismes se présentent sous une forme différente des trois types de particules précédents dans certaines microcolonies. Ils sont grossièrement sphériques et mesurent environ 500 nm de diamètre. Bourrés de ribosomes, ils montrent un nucléoïde

latéral et des régions très claires aux électrons (Pl. XXVIII). Ils sont limités par une membrane cytoplasmique et une paroi accolées l'une à l'autre au contact du nucléoïde comme chez les corps élémentaires et séparées dans le reste de la particule. Les zones claires aux électrons semblent correspondre à une augmentation très importante de l'espace périplasmique (Pl.XXVIII, Fig. 81). Ils dérivent de corps initiaux de grande taille (1 µm de diamètre), dont le cytoplasme est très clair aux électrons (Pl. XXVIII, Fig. 80).

En raison de la position du matériel nucléaire et du type de limite qui le borde, ces corps paraissent être le résultat d'une évolution anormale des corps initiaux vers le stade corps élémentaire.

On peut les considérer comme des corps intermédiaires dont l'évolution est arrêtée avant d'atteindre le stade des corps élémentaires. Ces particules se forment apparemment systématiquement dans certaines cellules de l'hépatopancréas de l'araignée. Elles forment alors de petites colonies composées d'une à quelques dizaines de particules (Pl. XXVIII, Fig. 79). Il ne semble pas y avoir dans la plupart de ces cellules de microcolonies évoluant normalement. On peut cependant trouver parfois quelques unes de ces particules dans des vacuoles renfermant des corps élémentaires normaux. Nous interprétons ces formes aberrantes comme l'équivalent, pour ce microorganisme, des corps géants observés chez d'autres procaryotes intracellulaires. Bien que leur taille ne soit pas exceptionnelle, et malgré l'absence d'une accumulation de substance sous une forme amorphe, fibrillaire ou cristalline, ils représentent en effet une évolution anormale du microorganisme comme c'est le cas pour les corps géants des *Rickettsiella*.

3 - Position systématique de l'agent infectieux.

La description que nous venons de faire du microorganisme correspond point par point à celle de *Porochlamydia buthi* si l'on considère que le pléomorphisme des corps initiaux et l'existence des formes de grande taille sont dus, dans le premier cas, à l'absence de rigidité de la paroi et, dans le second cas, à un développement anormal du microorganisme.

Bien que sa taille soit légèrement inférieure à celle du microorganisme décrit chez le scorpion et qu'il soit impossible d'obtenir un développement des germes lors d'essais d'infections croisées ce qui montre une certaine spécificité de ces deux procaryotes, nous ne considérons pas actuellement qu'il soit nécessaire de créer une nouvelle espéce sur ces seuls critères -taille et hôte- pour ce microorganisme. Il paraît plus raisonnable, afin de ne pas accroître le nombre des espèces à chaque découverte de microorganismes morphologiquement identiques chez un nouvel hôte, de ne le considérer que comme une sous-espèce de *Porochlamydia buthi*. Nous proposons donc de nommer ce procaryote *Porochlamydia buthi ssp. pisauri*.

Diagnose de la sous-espèce *Porochlamydia buthi pisauri*.

En plus des caractères portés dans la diagnose spécifique, cette sous-espèce se caractérise par la taille de ces corps élémentaires contrastés négativement sur grille : en moyenne 560 nm de long sur 240 nm de large et par son hôte l'araignée *Pisaura mirabilis* Cl. Localité d'origine : Prades-le-Lez (Hérault, France).

B - Etude histologique et étude en microscopie électronique de la rickettsiose à *Porochlamydia piriformis*.

1 - Histopathologie. (Pl. XXIX).

Cette rickettsie se développe principalement dans les cellules de l'hépatopancréas mais occasionne quelques lésions au niveau du tissu interstitiel et des tubes de Malpighi. Dans l'hépatopancréas le développement conduit à la formation de vacuoles de très grande taille ; généralement une seule vacuole est rencontrée par cellule (Pl. XXIX, Fig. 82,84). La taille des cellules augmente ainsi que la taille des noyaux. Les vacuoles de développement atteignent jusqu'à 60 µm de diamètre mais les plus nombreuses mesurent 25 à 30 µm. Les noyaux des cellules parasitées sont de grande taille (15 µm) ils ont un nucléole très développé (3,5 µm) et leur chromatine se présente sous la forme de granules ovoïdes de 1,5 µm de long sur 1 µm de large. Dans les cellules du tissu interstitiel et dans celles des tubes de Malpighi (Pl. XXIX, Fig. 82,83), quelques microcolonies se développent, elles res-

tent de petite taille et ne dépassent pas 7,5 µm de diamètre. Dans les autres tissus, nous n'avons pas observé de développement rickettsien.

2 - Microscopie électronique.

a) Vacuoles de développement et cycle.

De même que pour les trois microorganismes précédents, l'agent infectieux forme des microcolonies intracytoplasmiques qui croissent à l'intérieur de vacuoles. Comme chez la *Rickettsiella*, la maturation des microorganismes se fait de manière centrifuge et l'on note très souvent l'apparition de corps géants dans les microcolonies (Pl. XXXII, Fig. 95).

Les caractéristiques des autres particules que l'on rencontre dans ces microcolonies sont celles des trois stades du cycle chlamydien : corps initiaux, corps élémentaires et corps intermédiaires. La rupture de la membrane de la vacuole entraîne comme dans le cas de *P. buthi pisauri* des modifications de la forme des microorganismes (Pl. XXX, Fig. 86 ; Pl. XXXI , Fig. 90).

b) Les corps initiaux.

Les corps initiaux sont généralement pléomorphes (Pl. XXX, Fig. 85). Lorsqu'ils sont bacilliformes, ils mesurent de 1,2 à 1,5 µm de long pour un diamètre de 0,5 µm (Pl. XXX, Fig. 87). Limités par deux doubles membranes séparées par un espace périplasmique de 125 à 250 nm d'épaisseur, ils montrent au sein d'un cytoplasme clair aux électrons, un mésosome, un réseau tenu de fibrilles et des granules ribosomiens (Pl. XXX, Fig. 87). Ces derniers sont surtout nombreux à la périphérie des particules. Des figures de divisions sont visibles à ce stade. Lorsqu'il y a éclatement des vacuoles dans les cellules (Pl. XXX, Fig. 86 ; Pl. XXXI, Fig. 90), les corps initiaux sont parasphériques comme ceux de *Porochlamydia buthi*, ils ont une taille apparemment variable de 400 à 800 nm de diamètre et se présentent sous forme de deux sphères accolées lorsqu'ils sont en cours de division. La variabilité de la taille de ces particules sera discutée lors de l'étude des corps intermédiaires.

c) Les corps élémentaires.

L'examen des suspensions de corps élémentaires après coloration négative (Pl. XXXI, Fig. 91) montre l'existence d'une grande variabilité dans la taille de ces particules en forme d'ovoïdes plus ou moins réguliers. Ces formes de résistance mesurent 925 ± 75 nm de long sur 290 ± 35 nm de large. On y décèle un dépôt latéral de colorant ce qui permet d'y distinguer deux régions : une zone étroite convexe claire, une zone plus large légèrement creuse où le colorant se dépose et au sein de laquelle est visible une structure lenticulaire de 150 à 200 nm de long. Les formes infectieuses sont comme celles des deux autres *Porochlamydia* recouvertes d'une fine ornementation.

Sur coupe, les corps élémentaires présentent de très nombreux aspects (Pl. XXXII) ce qui traduit une morphologie plus complexe que celle des *Porochlamydia* précédement décrites. De grande taille, elles atteignent jusqu'à 1100 nm de long , 250 nm de large et une épaisseur variant de 70 à 150 nm (Moyenne 800 nm x 230 x 100 et 85 nm); la reconstitution de la forme exacte est assez délicate. En raison de leur grande taille et de leur faible épaisseur, les sections longitudinales complètes (Pl. XXXII, Fig. 93,94) sont rares et généralement peu nettes ; les sections transversales sont souvent piriformes (Pl. XXXII, Fig. 92,93) et traduisent une dissymétrie des particules. Cette dissymétrie existe également au niveau interne ; le nucléoïde dense aux électrons est latéral ; il occupe environ la moitié du volume des particules emplissant la totalité de la région étroite de ces dernières. Les sections piriformes et les sections longitudinales entièrement denses aux électrons montrent bien cette répartition (Pl. XXXII, Fig. 93,94). Le cytoplasme occupe l'autre moitié des particules ; quantitativement plus important que le nucléoïde, il est légèrement dense aux électrons et renferme des alignements réguliers de ribosomes. Un système membranaire développé en relation avec la membrane cytoplasmique, correspond à la structure ellipsoïde visible sur les préparations contrastées négativement. Les limites de ces corps sont celles des corps élémentaires de *Porochlamydia* et se caractérisent par un aspect perforé de la paroi restructurée.

d) Les corps intermédiaires.

Les corps intermédiaires de ce microorganisme sont rares sur coupes ultrafines. Le développement du microorganisme ne semble pas être synchrone au sein d'une même microcolonie, et la transformation des corps initiaux en corps élémentaires doit être très rapide.

La maturation en corps élémentaires se fait de manière continuelle dans la région périphérique des microcolonies, au fur et à mesure de leur croissance. On note dans cette région la présence de particules bacilliformes proportionnellement plus allongées (Pl. XXXI, Fig. 89) que les corps initiaux. Elles mesurent 730 à 800 nm de long sur environ 220 nm de diamètre et correspondent aux corps intermédiaires. Ces corps sont plus denses aux électrons que les corps initiaux et montrent souvent une légère constriction (Pl. XXX , Fig. 88 ; Pl. XXXI , Fig. 89). Cette constriction ne semble pas traduire un début de division car des particules moitié moins grandes ne sont jamais rencontrées.

On assiste au cours du stade intermédiaire à une densification progressive et à une restructuration des limites cellulaires (Pl. XXX, Fig. 88 ; Pl. XXXI, Fig. 89,90). Le nucléoïde se condense au contact des limites cellulaires comme pour les deux *Porochlamydia* précédentes mais reste localisé à la moitié des particules. Nous ne pouvons pas dire à l'heure actuelle pourquoi au cours de la transformation il y a passage par des formes montrant une sorte de constriction.

Lorsqu'il y a ouverture des vacuoles de développement, les corps initiaux deviennent sphériques (Pl. XXX, Fig. 86 ; Pl. XXXI, Fig. 90). Simple sphère, ou double sphère dans le cas de forme en voie de division, leur taille est variable. On peut les répartir en quatre groupes en fonction de leur diamètre qui est d'environ pour chaque groupe de particules de 800 nm, 650 nm, 500 nm et 400 nm. La relation entre ces divers groupes apparaît lorsque l'on calcule le volume des particules les constituant. Celui des particules de 800 nm de diamètre ($268\ 10^6\ nm^3$) est à peu près le double de celui des particules de 650 nm de diamètre ($143\ 10^6\ nm^3$) ; ce derniers est double des particules de 500 nm de diamètre ($65\ 10^6\ nm^3$) et quadruple de celui des parti-

cules de 400 nm de diamètre (33 10^6 nm^3). Si l'on calcule, pour les corps initiaux de 800 nm de diamètre, la taille qu'aurait les particules sous leur forme bacilliforme, on obtient des corps de 1,36 µm de long sur 0,5 µm de diamètre ce qui correspond aux valeurs mesurées pour certaines des particules des vacuoles intactes. En ce qui concerne le volume des corps intermédiaires bacilliformes, il est de l'ordre d'une trentaine de millions de nm^3, on peut donc les assimiler aux plus petites formes sphériques observées (400 nm de diamètre).

Il apparaît donc que pour ce microorganisme [illegible], un corps initial peut être à l'origine de plusieurs corps élémentaires par une série de divisions successives ; à partir d'un corps initial de 800 nm de diamètre 8 corps intermédiaires de 400 nm de diamètre sont formés à la suite de 3 séries de divisions. Ce phénomène de "division multiple" n'avait pas été noté chez les deux autres *Porochlamydia*.

e) Les corps géants.

Ils sont rencontrés dans toutes les vacuoles de développement des cellules digestives. De forme irrégulière, ils sont pour la plupart grossièrement sphériques, leur diamètre étant de 2 à 2,5 µm (Pl. XXXII, Fig. 95). Certains d'entre eux, allongés, peuvent atteindre 3 µm de long. Limités par deux doubles membranes équivalentes à celles des corps initiaux, ils se présentent sous un aspect très hétérogène. Ils renferment un cytoplasme très granuleux généralement rejeté dans la partie corticale des particules. Au sein de ce cytoplasme sont présents des faisceaux de fibres occupant toute la largeur des particules. Ces fibres d'environ 100 Å de diamètre sont disposées régulièrement, la section des faisceaux montrant un arrangement cristallin de 150 Å de périodicité. Une substance très claire aux électrons occupe les espaces libres entre les faisceaux fibrillaires.

3 - Position systématique.

Les caractères de ce microorganisme permettent de le placer dans le genre *Porochlamydia*.

Son cycle de développement est identique à celui décrit pour l'espèce type du genre ; il passe par des formes végétatives (corps initiaux), des formes de maturation (corps intermédiaires) et des formes de résistance infectieuses (corps élémentaires).

L'organisation du microorganisme aux différents stades du cycle est également comparable à celle notée chez *Porochlamydia buthi*. En particulier, chez les corps élémentaires, on note une ségrégation nette du matériel nucléaire et du matériel cytoplasmique ainsi qu'une paroi à aspect perforé.

Il diffère de l'espèce type de *P. buthi* au niveau des corps élémentaires par la morphologie et la disposition du nucléoïde par rapport au cytoplasme et nous jugeons ces différences suffisantes pour considèrer que ce microorganisme fait partie d'une nouvelle espèce dans le genre *Porochlamydia* : *Porochlamydia piriformis n.sp.*

Diagnose de l'espèce *Porochlamydia piriformis*.

En dehors des caractères du genre, *P. piriformis* se caractérise par la morphologie et l'organisation de ces corps élémentaires. Ils sont de grande taille, de forme générale ovoïde et de section piriforme. Ils mesurent en moyenne 925 nm de long sur 290 nm de large, sur grille et contrastés négativement. Le nucléoïde est regroupé le long de la partie étroite des particules alors que le cytoplasme en occupe la partie large. Le système membranaire interne est très développé ; de 150 à 200 nm de long, il est situé dans le nucléoïde des particules.

Les corps initiaux atteignent 800 nm de diamètre lorsqu'ils sont sphériques ; ils peuvent subir une série de divisions à la fin de la phase végétative avant de donner les corps intermédiaires qui sont à l'origine des corps élémentaires.

Espèce hôte : l'araignée *Pisaura mirabilis*.

Localité : Prades-le-Lez, (Hérault , France).

PLANCHE XIV

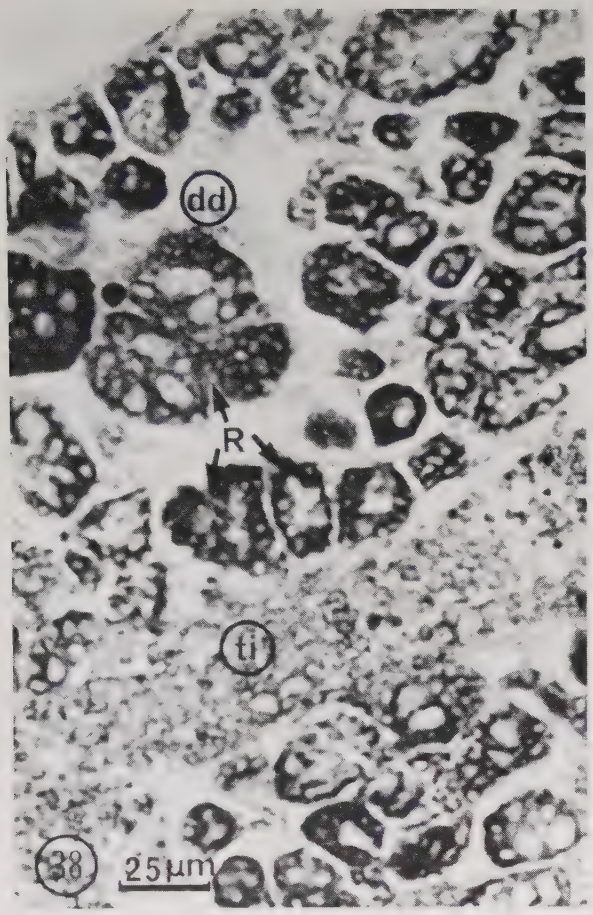
Rickettsiose de *Pisaura mirabilis*.
Rickettsiella sp.
Histopathologie.

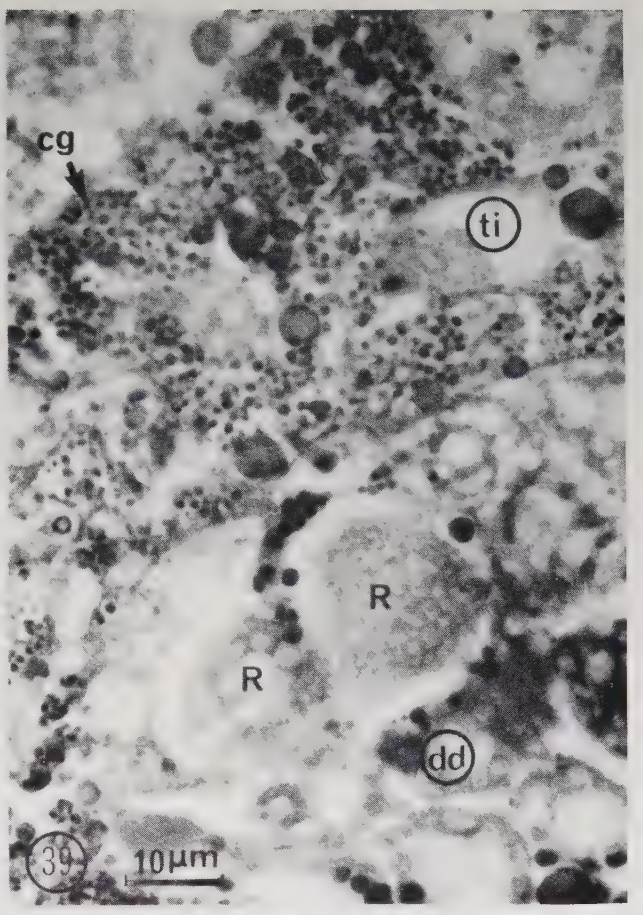
Fig. 38. : Section d'hépatopancréas. Les rickettsies forment des microcolonies de grande taille (R) dans les cellules des diverticules digestifs (dd). ti : tissu interstitiel. Coloration de Mann-Dominici. X 480.

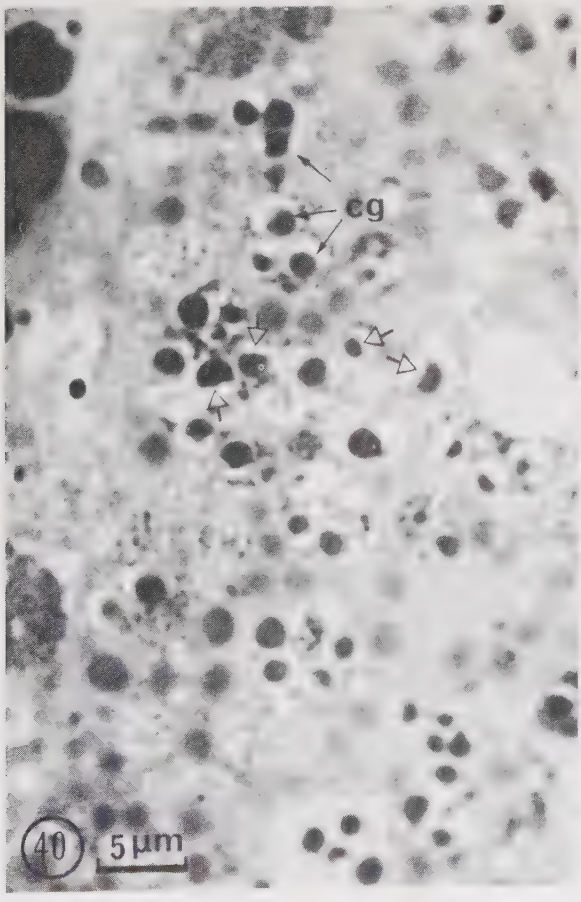
Fig. 39. : Section d'hépatopancréas après coloration par l'azan de Heidenhain. En dehors des grandes microcolonies (R) des cellules des diverticules digestifs (dd), on note dans le tissu interstitiel (ti) la présence de microcolonies de petite taille renfermant des corps de grande taille (cg). X 1300.

Fig. 40. : Coupe semi-fine de tissu interstitiel. Les cellules renferment de nombreuses petites microcolonies ou apparaissent des corps de grande taille (cg). Ceux-ci présentent souvent une forme de croissant (⊲). Coloration au bleu de toluidine boraté. X 2300.

Fig. 41. : Coupe semi-fine d'hépatopancréas. On peut noter la différence d'aspect des microcolonies qui se développent dans les cellules digestives des diverticules (dd) et dans les cellules du tissu interstitiel (ti). R : microcolonies des cellules digestives, Va : microcolonies des cellules interstitielles. Coloration au bleu de toluidine boraté. X 1200.


dd
R
ti
38
25µm


cg
ti
R
R
dd
39
10µm


cg
40
5µm

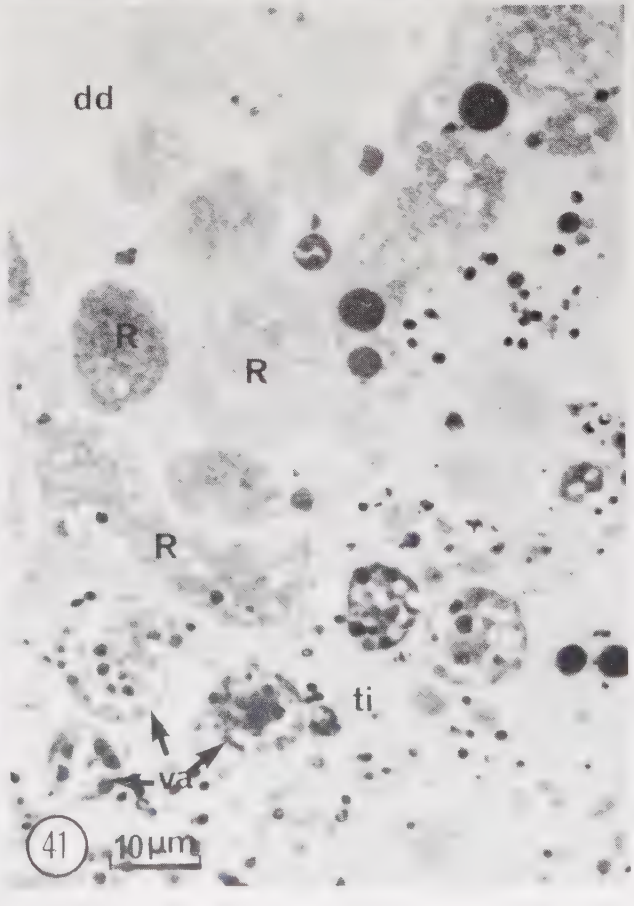

dd
R
R
R
ti
va
41
10µm

PLANCHE XV

Rickettsiose de *Pisaura mirabilis*.
Rickettsiella sp.
Ultrastructure.

Fig. 42. : Portion d'une microcolonie de *Rickettsiella sp.* renfermant les quatre types de particules apparaissant au cours du cycle. ci : corps initiaux, ct : corps intermédiaires, ce : corps élémentaires et cg : corps géants. X 22500.

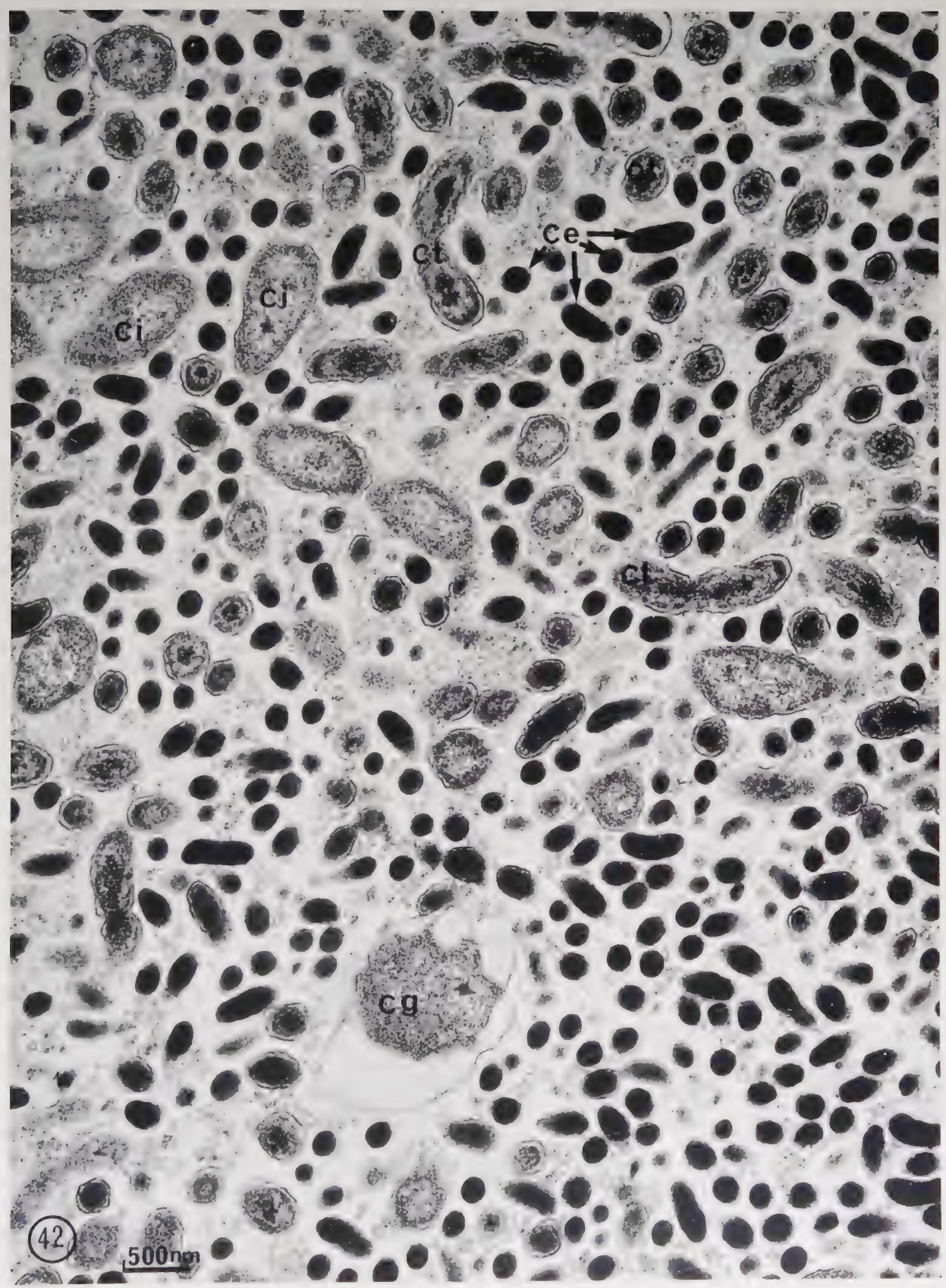

Ce
Ct
Cj
Ci
Cl
Cg
42
500nm

PLANCHE XVI

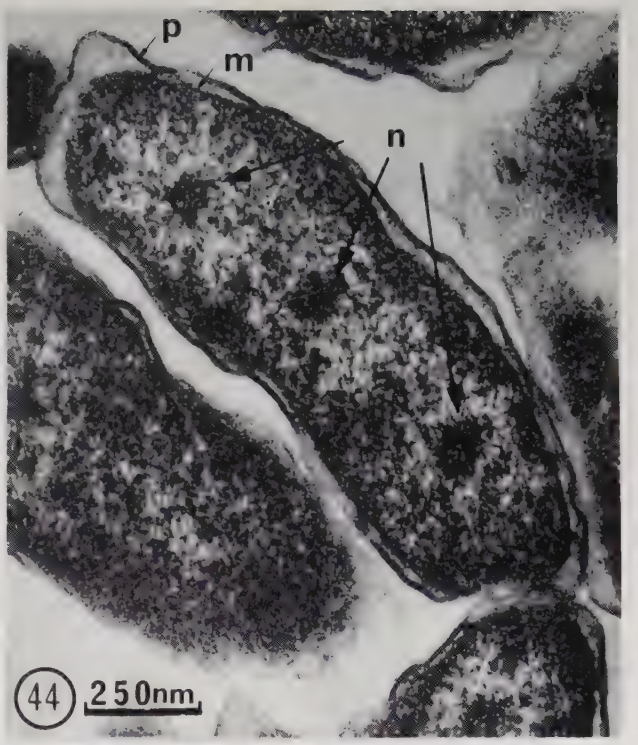
Rickettsiose de *Pisaura mirabilis*.
Rickettsiella sp.
Ultrastructure.

Fig. 43. : Jeune microcolonie ne renfermant que des corps initiaux (ci). X 22000.

Fig. 44. : Détail d'un corps initial. On distingue par endroit la paroi (p) et la membrane cytoplasmique (m). 3 nucléoïdes (n) sont également visibles dans le microorganisme. X 60000.

Fig. 45. : Microcolonie au début de la transformation des corps initiaux (ci) en corps élémentaires (ce). Les corps intermédiaires (ct) sont souvent en voie de division et leur nucléoïde (n) et bien individualisé. X 12800.

ci
43
500nm


p
m
n
44
250nm

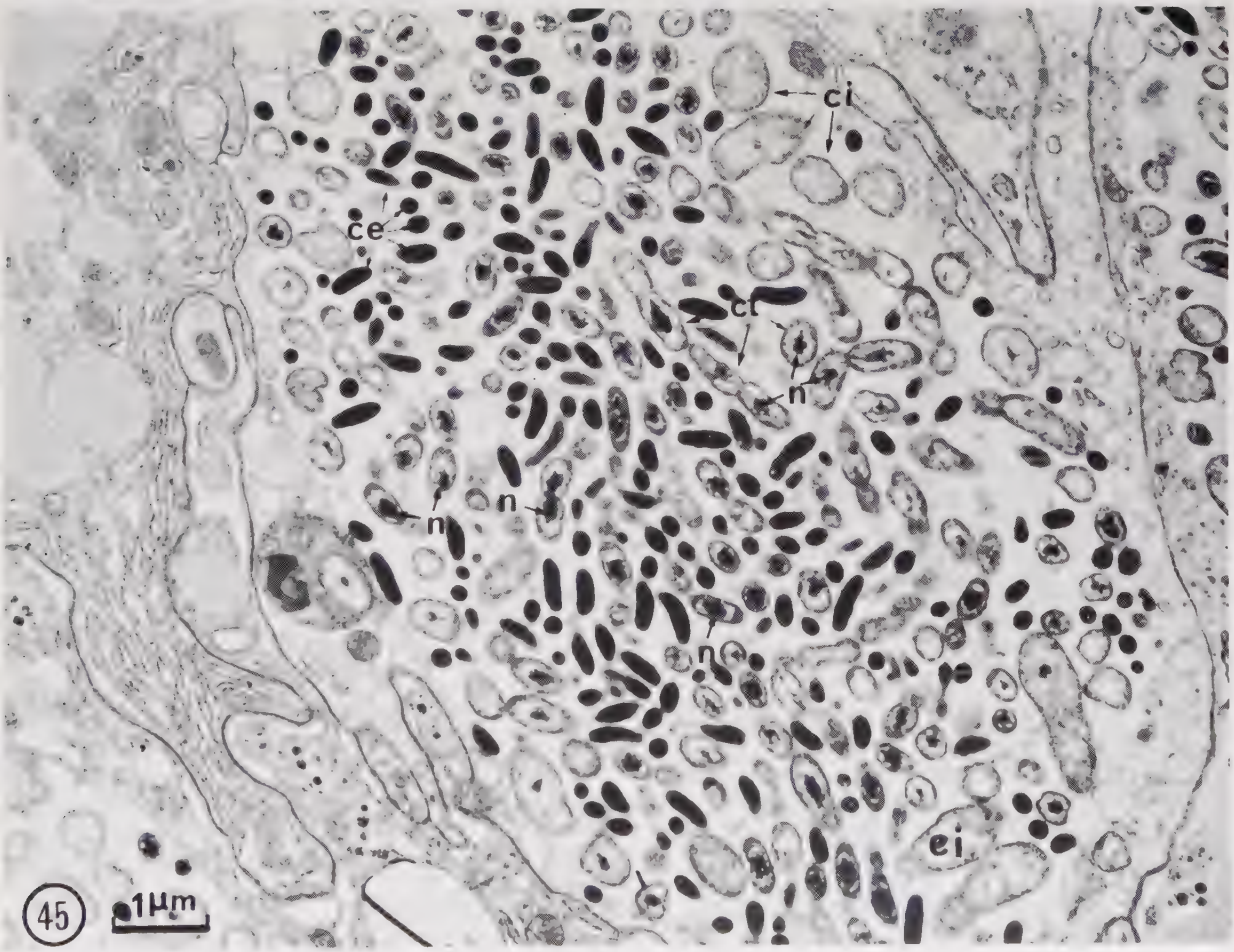

ci
ce
ci
n
n
n
n
ei
45
1µm

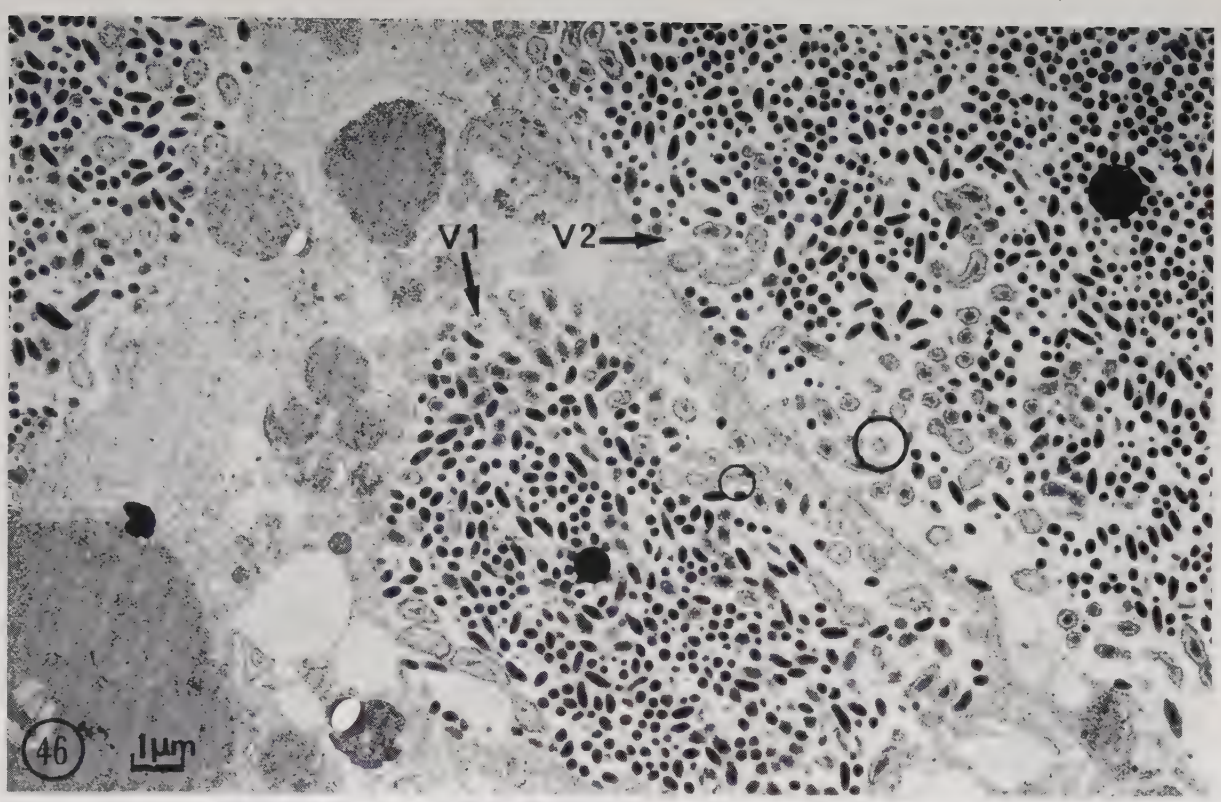
PLANCHE XVII

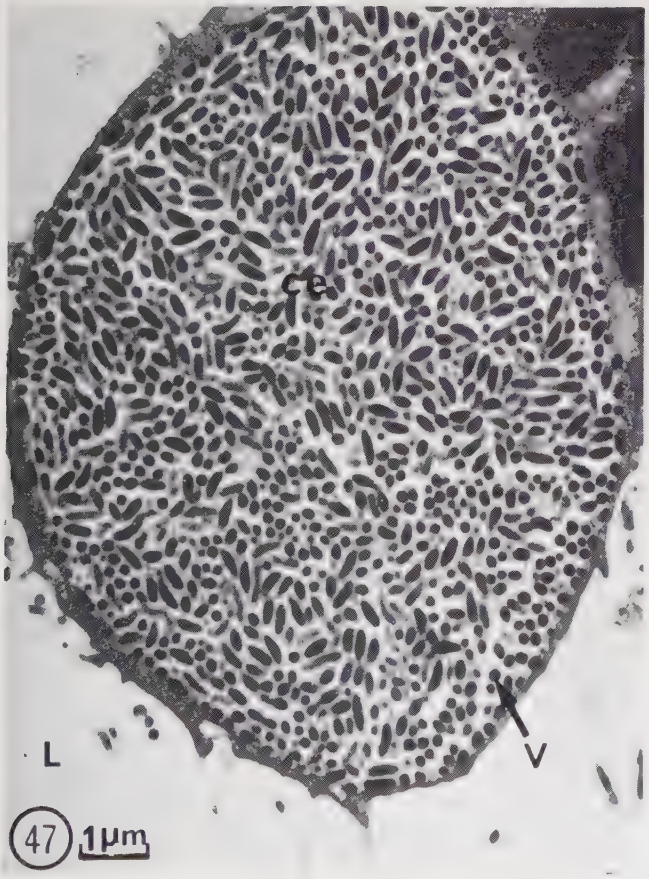
Rickettsiose de *Pisaura mirabilis*.
Rickettsiella sp.
Ultrastructure des corps élémentaires.

Fig. 46. : Microcolonie assez âgée. On remarque que les corps élémentaires occupent la région centrale (●) des vacuoles de développement v1 et v2. La zone périphérique de la vacuole (○) renferme des corps intermédiaires et quelques corps initiaux. X 7000.

Fig. 47. : Microcolonie très âgée. La vacuole v ne renferme que des corps élémentaires (ce). Elle semble prête à s'ouvrir dans la lumière (L) du diverticule digestif . X 9000.

Fig. 48. : Corps élémentaires (ce) contrastés négativement après purification. On note l'existence de dépôts de phosphotungstate de sodium à la surface des particules. X 31000.


V1
V2
46
1µm


ce
L
V
47
1µm

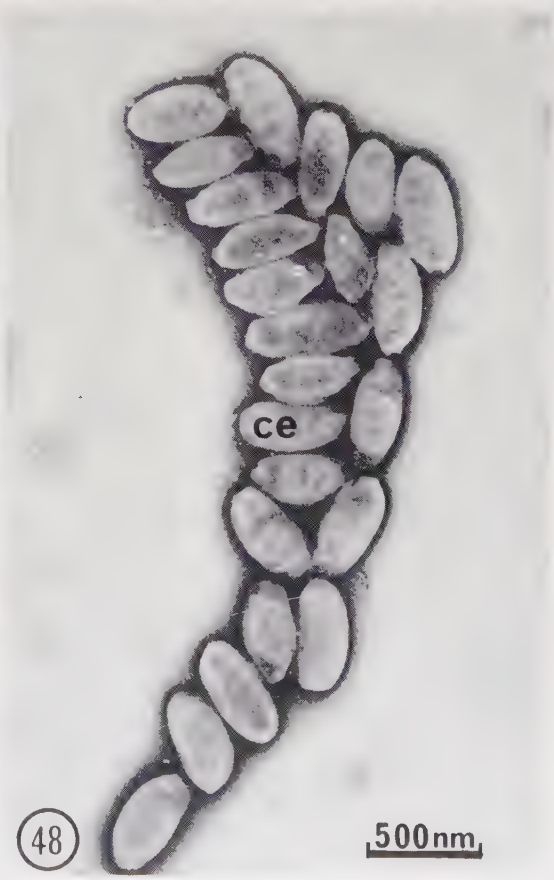

ce
48
500nm

PLANCHE XVIII

Rickettsiose de *Pisaura mirabilis*.

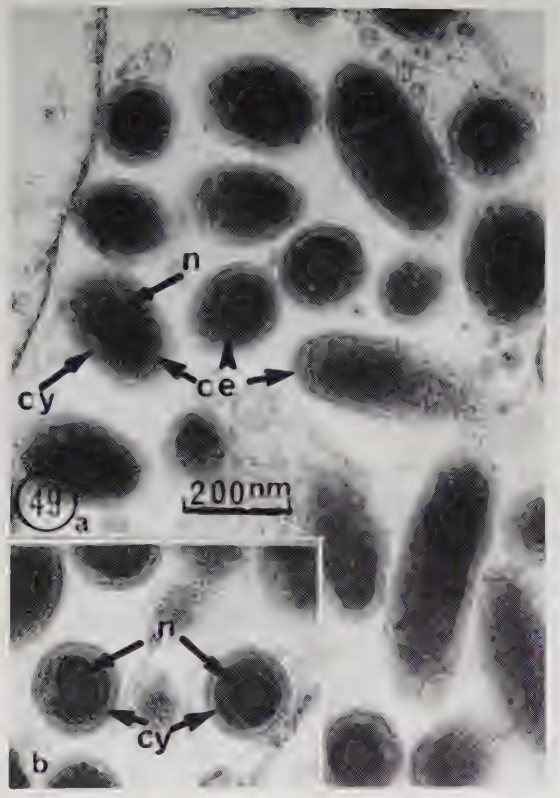
Rickettsiella sp.

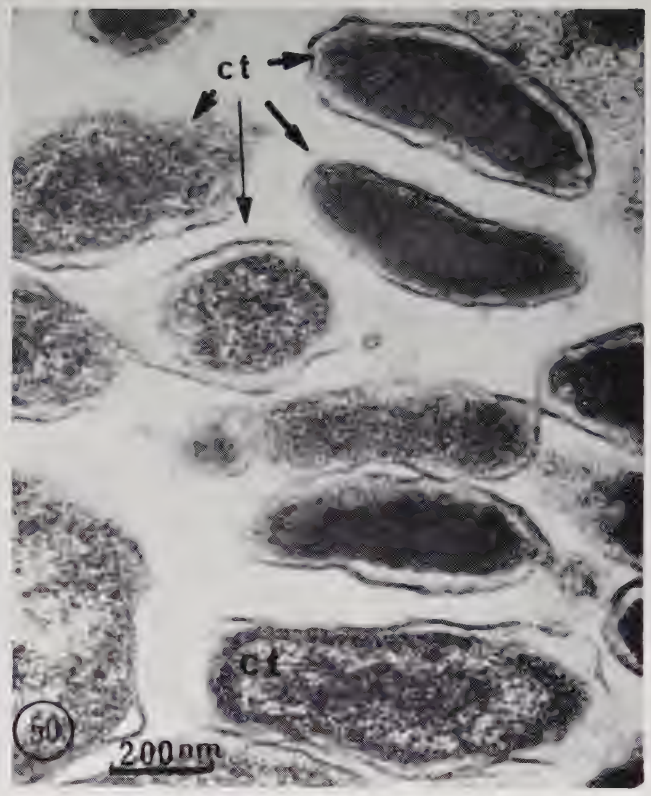
Ultrastructure des corps élémentaires et des corps intermédiaires.

Fig. 49 a-b : Corps élémentaires (ce). Le nucléoïde central (n) grossièrement polyedrique, est entouré par un cytoplasme (cy) très réduit. X 70000.

Fig. 50. : Corps intermédiaires (ct) à divers stades de leur évolution. X 70000.

Fig. 51. : Vacuole de développement âgée renfermant quelques corps initiaux (ci) et des corps intermédiaires. Leur alignement (→ et ⇨) suggère l'existence de divisions tardives conduisant à la formation de chaînettes. X 23500.


n
cy
ce
49 a
200nm
n
cy
b


ct
ct
50
200nm

ct
51
500nm

PLANCHE XIX

Rickettsiose de *Pisaura mirabilis*.

Rickettsiella sp.

Ultrastructure.

Fig. 52. : Microcolonie au début de la transformation des corps initiaux (ci) en corps éléméntaires. En dehors des nombreux corps intermédiaires (ct) est visible un corps géant (cg) au début de son évolution. On remarque la présence de 2 nucléoïdes (n) dans ce corps géant. X 40000.

ct
ci
n
cg
ct
ci
ci
ct
52
500nm

PLANCHE XX

Rickettsiose de *Pisaura mirabilis*.
Rickettsiella sp.
Ultrastructure des corps géants.

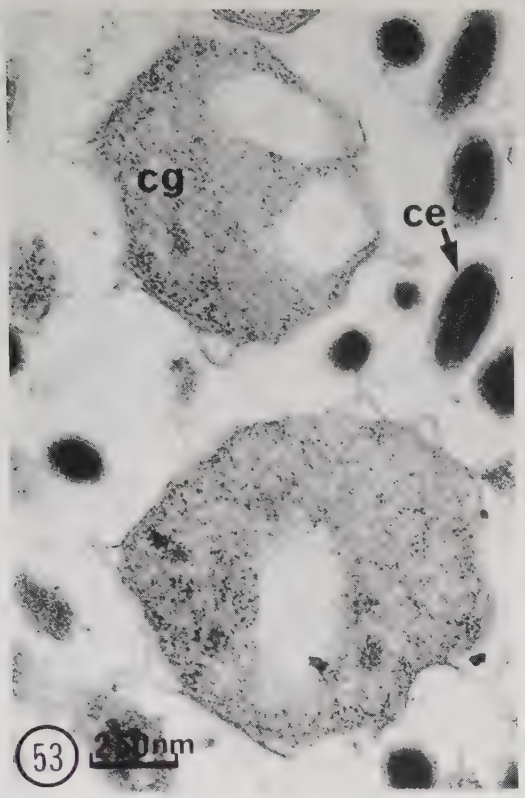
Fig. 53. : Premier stade de l'évolution des corps initiaux en corps géants (cg). (ce : corps élémentaires). X 46000.

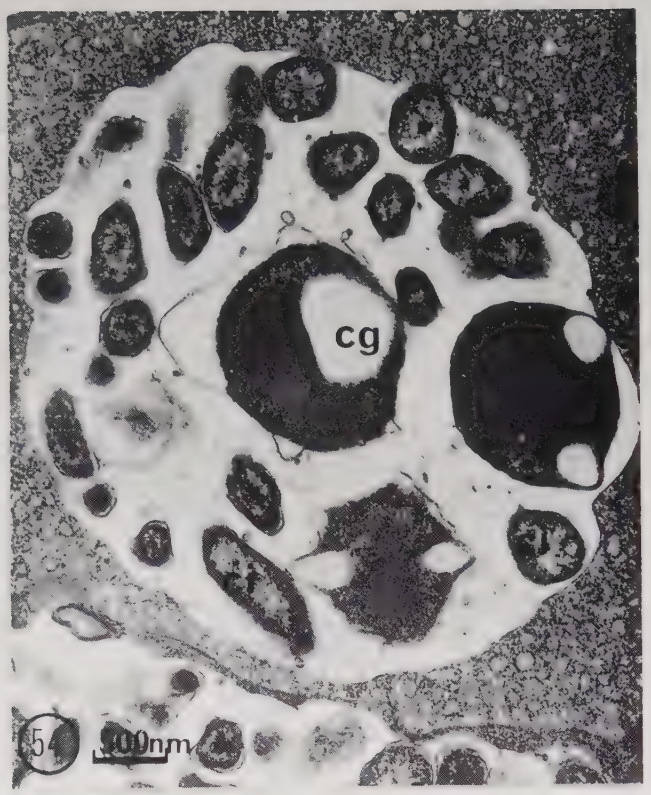
Fig. 54. : Vacuole jeune renfermant des corps géants (cg) en fin d'évolution et des corps initiaux (ci). X 20000.

Fig. 55. : Vacuole âgée ne renfermant plus que des corps élémentaires (ce) et des corps géants (cg). za : zone amorphe, zc : zone claire, zg : zone granulaire. X 24000.

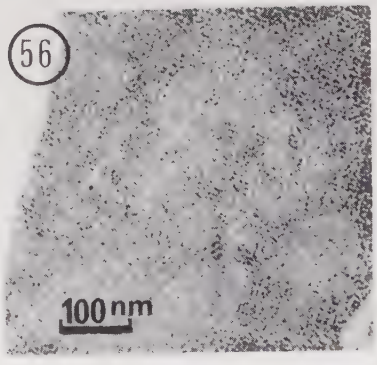
Fig. 56. : Détail de la zone généralement amorphe chez les corps géants. Dans ce cas un réseau paracristallin est visible dans cette zone. X 94000.

Fig. 57. : Détail d'un corps géant montrant des structures membranaires (►) dans la région cytoplasmique granulaire. X 36000.


cg
ce
53
250nm


cg
54
100nm

ce
zg
zc
cg
zg
za
zg
zc
55
500nm


56
100nm

57
250nm

PLANCHE XXI

-- Rickettsiose de *Pisaura mirabilis*.
Rickettsiella sp.
Développement.

Fig. 58. : Portion d'hépatopancréas montrant le développement différent du microorganisme dans deux cellules voisines C1 et C2. La cellule C1 où l'on observe des cristaux de guanine (g) renferme de petites microcolonies riches en corps géants (cg) et pauvres en corps élémentaires si on les compare à la microcolonie de la cellule C2 qui ne renferme que des formes constituant le cycle normal du microorganisme. X 12800.

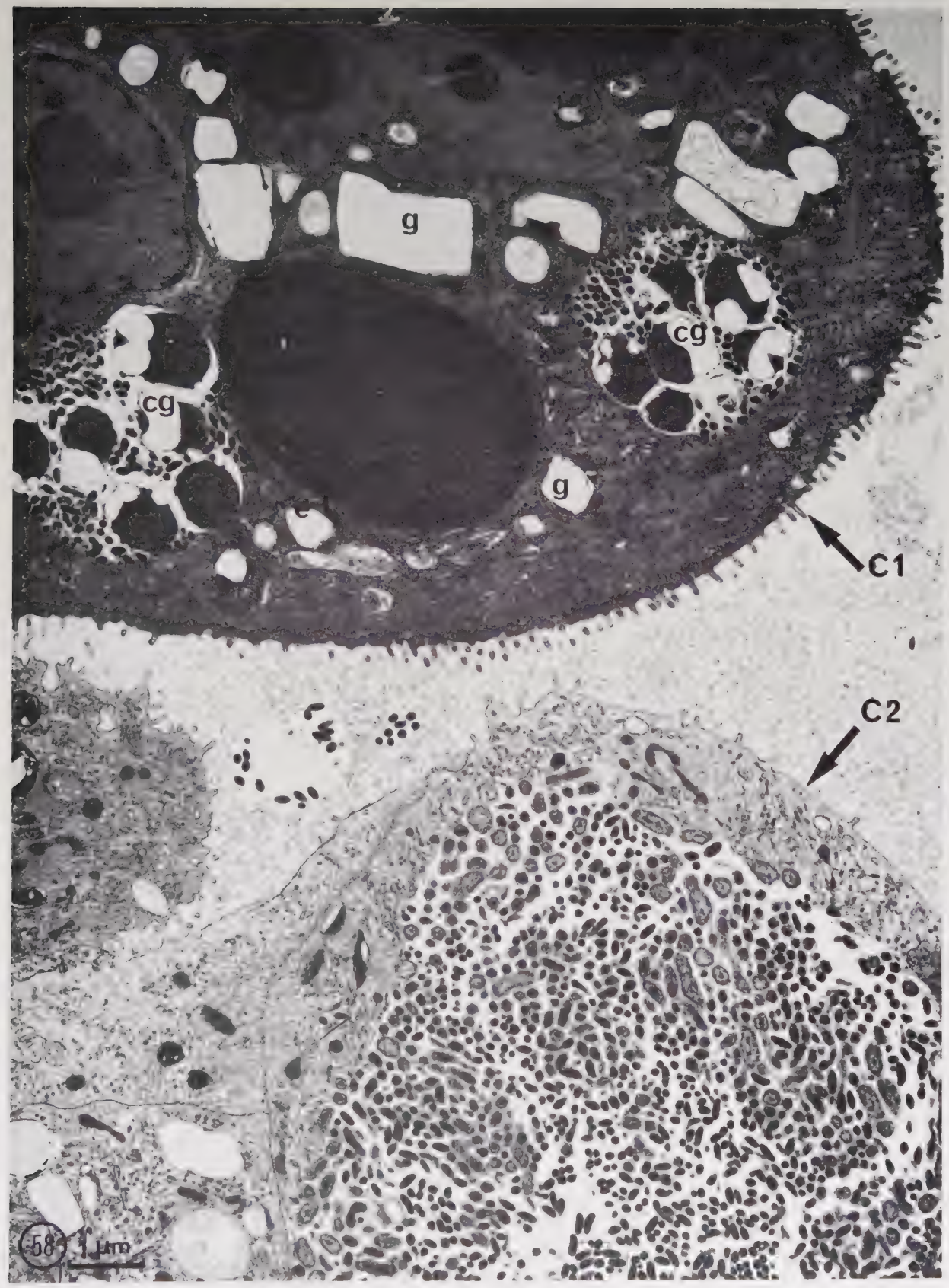

g
cg
cg
g
C1
C2
1 µm

PLANCHE XXII

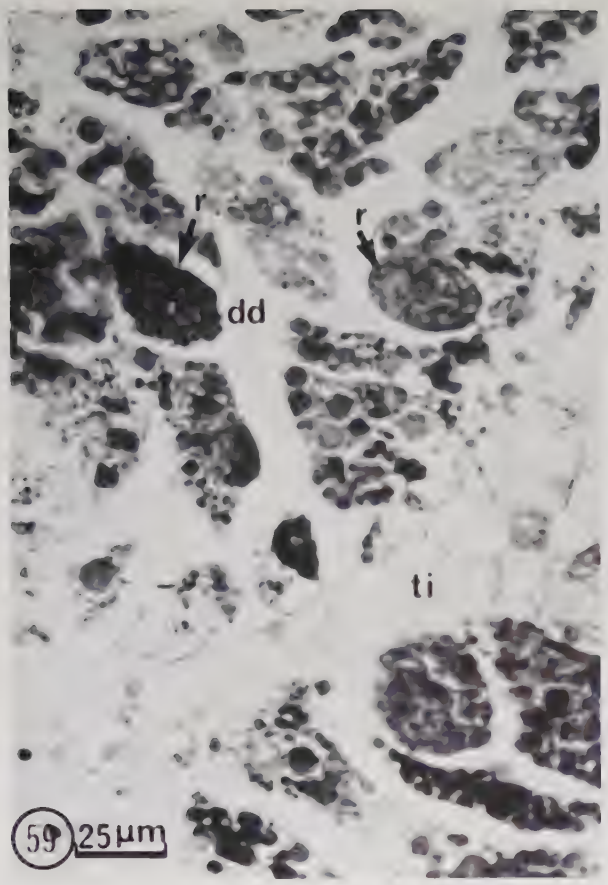
Rickettsiose de *Pisaura mirabilis*.
Porochlamydia buthi pisauri.
Histopathologie.

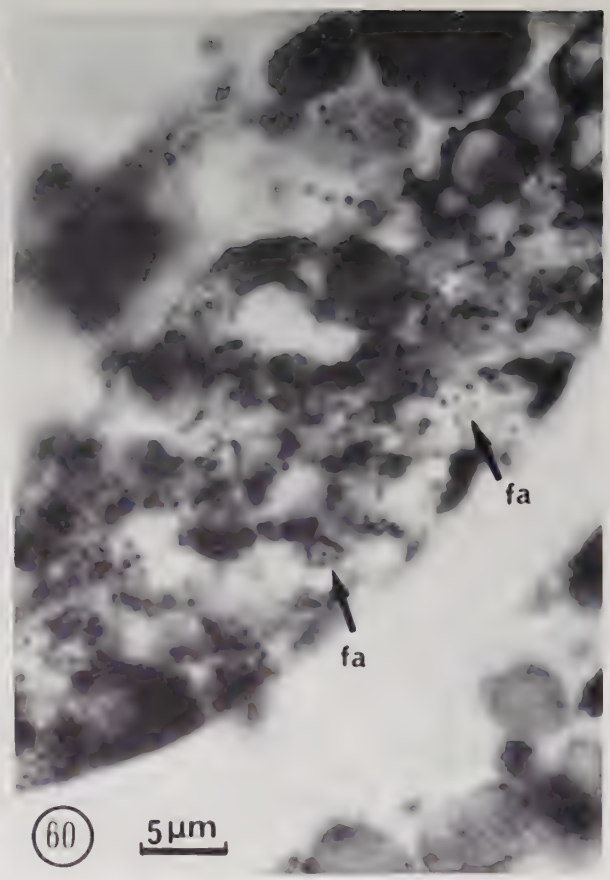
Fig. 59. : Portion d'hépatopancréas de *Pisaura mirabilis* montrant le développement du microorganisme dans les cellules digestives (dd : diverticule digestif, r : microcolonies). Le tissu interstitiel (ti) n'est pas attaqué. Coloration de Mann-Dominici. X 470.

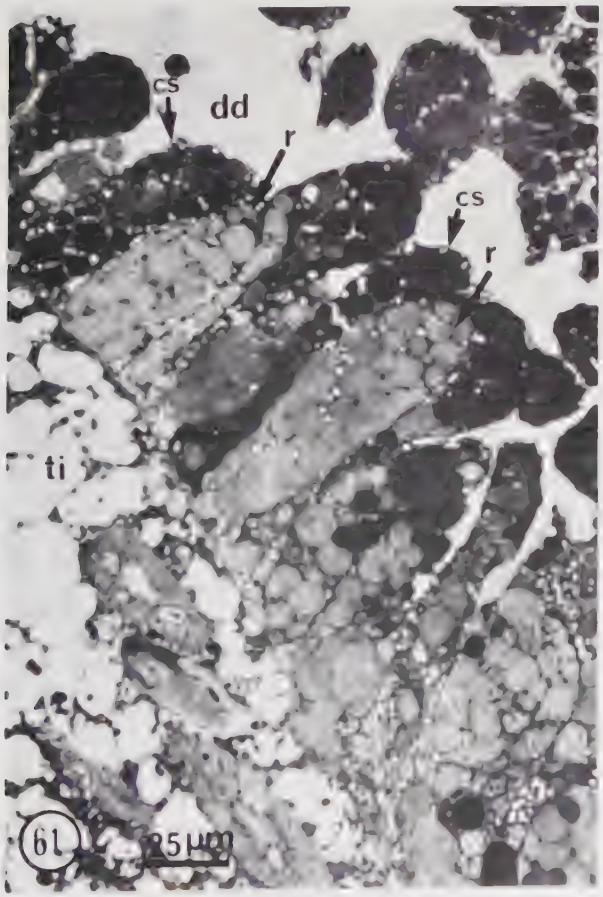
Fig. 60. : Détail d'une cellule à ferment de *Pisaura mirabilis*. Les microorganismes sont visibles individuellement au sein de petites microcolonies (fa) . Coloration de Mann-Dominici. X 2340.

Fig. 61. : Coupe semi-fine de l'hépatopancréas montrant des cellules bourrées de microcolonies (r) voisinant avec des cellules apparement saines (cs). dd : diverticule digestif, ti : tissu interstitiel. Coloration au bleu de toluidine boraté. X 470.

Fig. 62. : Coupe semi-fine d'une cellule absorbante renfermant des microcolonies âgées. L'alignement régulier des microorganismes confère un aspect strié aux microcolonies (↕↕↕ alignement de particules). Coloration au bleu de toluidine boraté. X 2340.


r
r
dd
ti
59
25µm


fa
fa
60
5µm


cs
dd
r
cs
r
ti
61
25µm

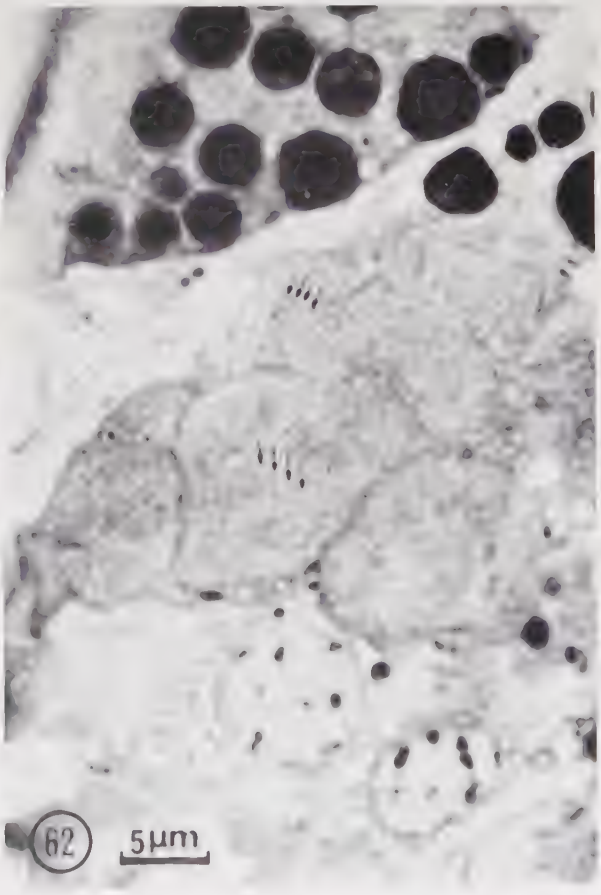

62
5µm

PLANCHE XXIII

Rickettsiose de *Pisaura mirabilis*.
Porochlamydia buthi pisauri.
Ultrastructure.

Fig. 63. : Vacuole intracytoplasmique renfermant *Porochlamydia buthi pisauri* à divers stades de son développement : corps initiaux (ci), corps intermédiaires (ct), corps élémentaires (ce). Le nucléoïde (n) est visible dans les corps intermédiaires et les corps élémentaires. d : forme en voie de division. X 38000.

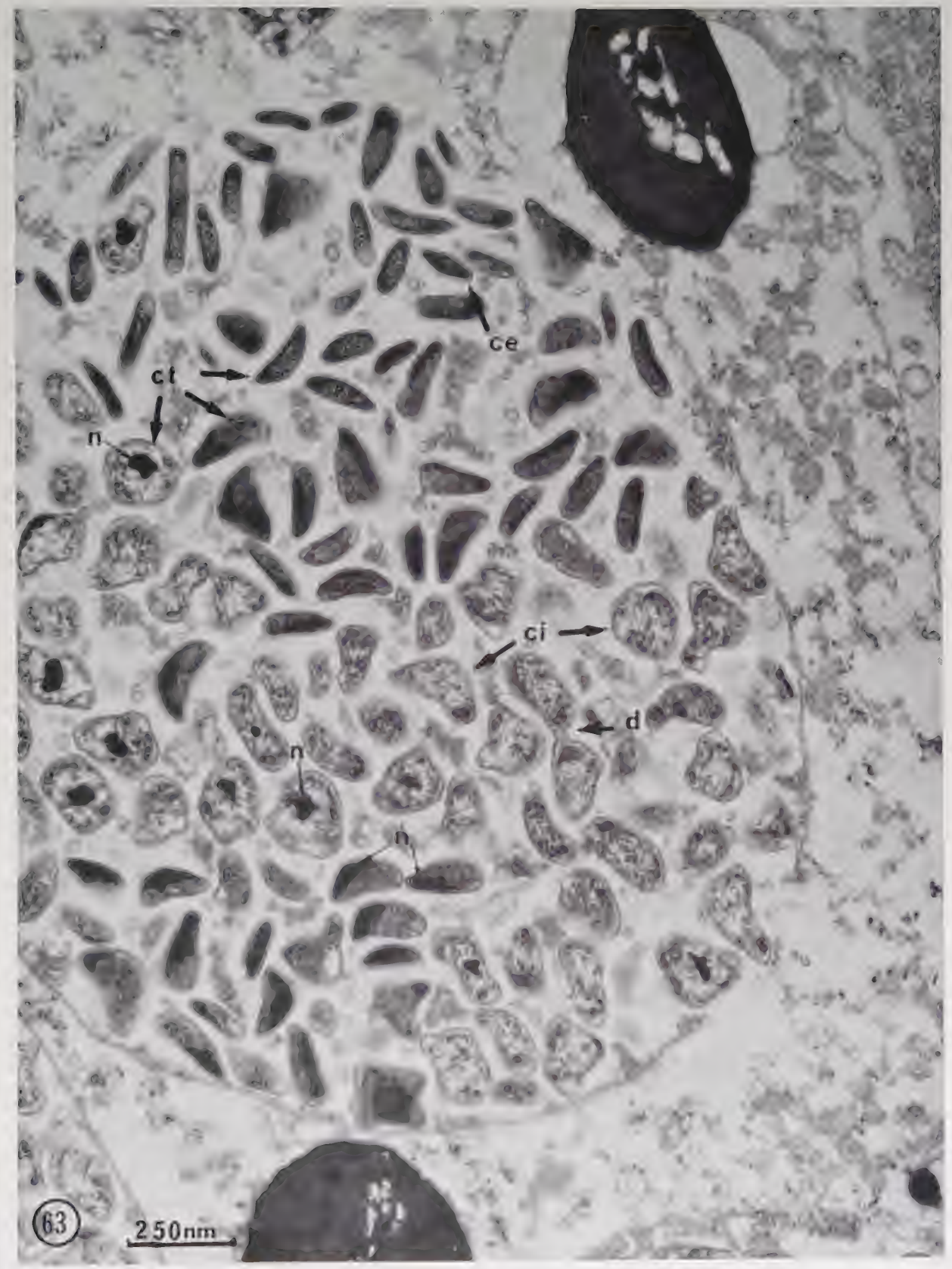

ce
ct
n
ci
d
n
n
63
250nm

PLANCHE XXIV

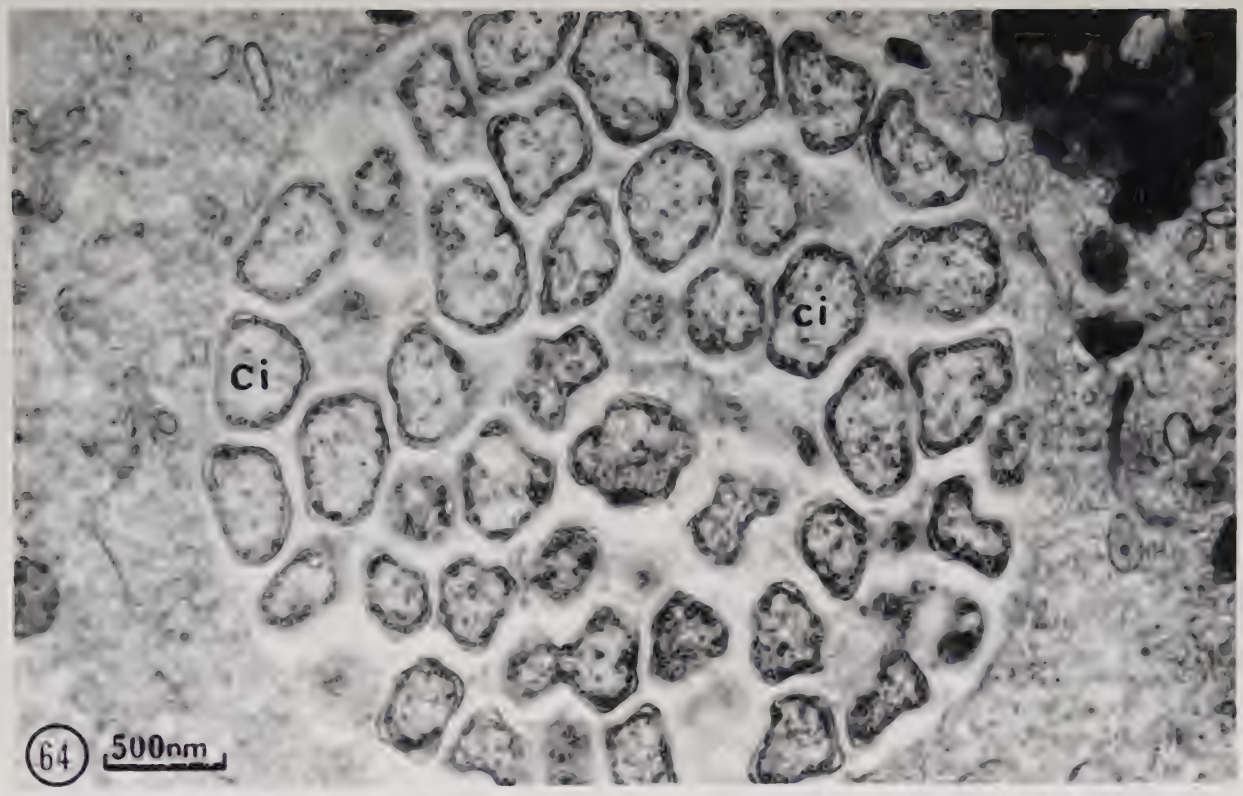
Rickettsiose de *Pisaura mirabilis*.
Porochlamydia buthi pisauri.
Ultrastructure des corps initiaux.

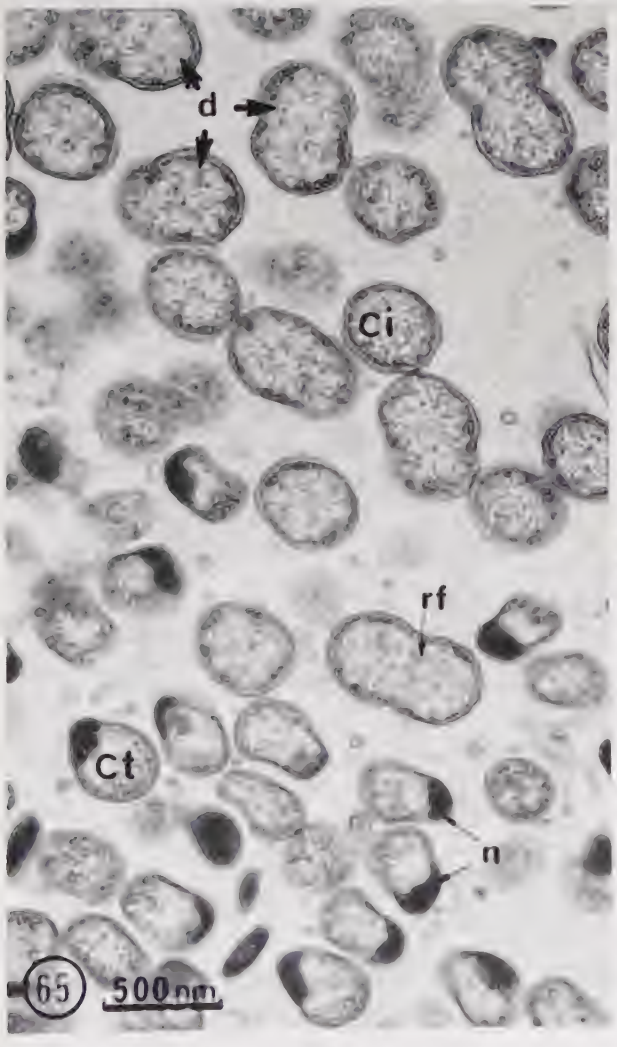
Fig. 64. : Jeune microcolonie entièrement constituée de corps initiaux (ci). On remarque l'absence de forme définie du microorganisme. X 31500.

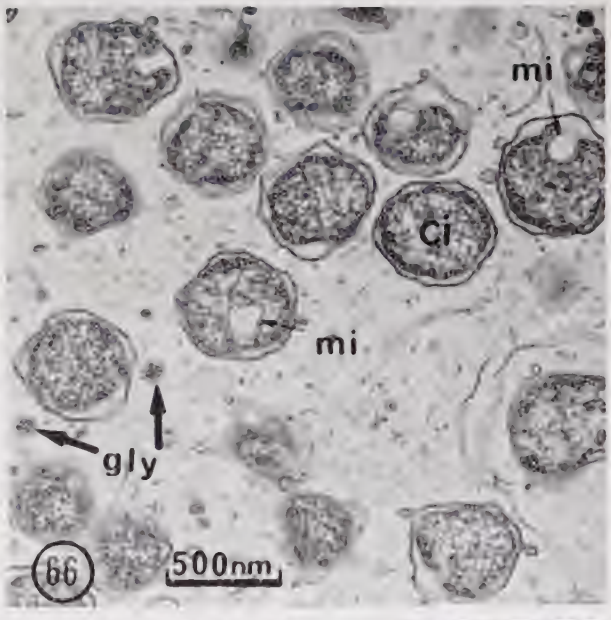
Fig. 65. : Aspect des microorganismes à la suite de la rupture de la membrane de la vacuole de développement. Les corps initiaux (ci) sont sphériques. Les corps intermédiaires (ct) se caractérisent par l'existence d'un nucléoïde (n) latéral. rf : réseau fibrillaire correspondant au matériel nucléaire dispersé des corps initiaux. d : corps initiaux en voie de division. X 30000.

Fig. 66. : Corps initiaux (ci) dans une vacuole où le matériel cytoplasmique de la cellule hôte a pénétré comme l'indique la présence de grains de glycogène (gly). Un système membranaire interne (mi) devient visible dans les corps initiaux altérés. X 30000.

Fig. 67. : Détail d'un corps initial fortement altéré (ci). La paroi (p) est visible de même que la membrane cytoplasmique (m) en relation avec le système membranaire interne (mi). 74000.


Ci
ci
64
500nm


d
Ci
rf
Ct
n
65
500nm


mi
Ci
mi
gly
66
500nm

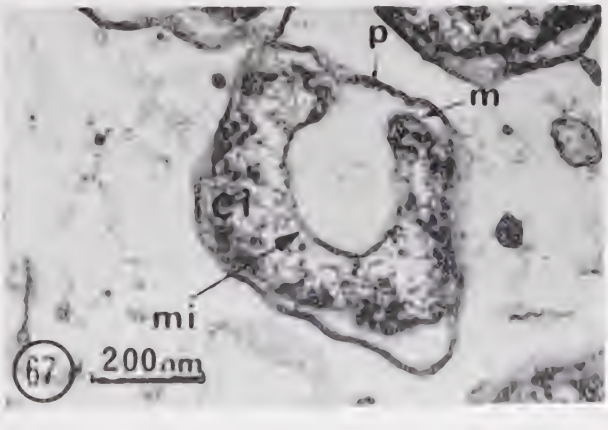

p
m
Ci
mi
67
200nm

PLANCHE XXV

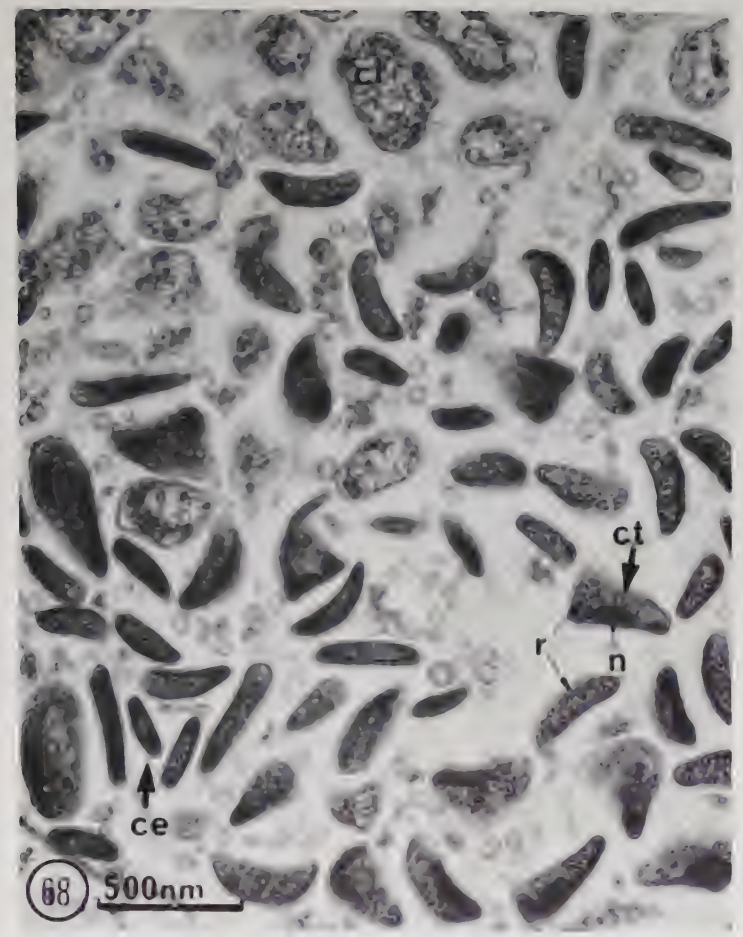
Rickettsiose de *Pisaura mirabilis*.
Porochlamydia buthi pisauri.
Ultrastructure des corps intermédiaires et des corps élémentaires.

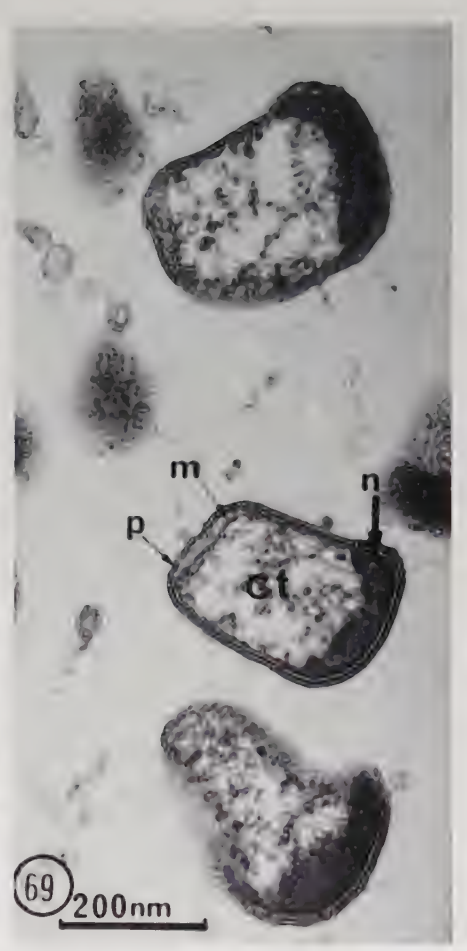
Fig. 68. : Début de transformation des corps initiaux (ci) en corps élémentaires (ce). Les corps intermédiaires (ct) ont souvent une forme en croissant. Leur nucléoïde (n) est latéral et les ribosomes (r) sont nettement visibles. X 38000.

Fig. 69. : Corps intermédiaires (ct) dans une vacuole altérée. Les limites cellulaires sont restructurées au contact du nucléoïde (n). La paroi (p) est séparée de la membrane cytoplasmique (m) par un important espace périplasmique dans le reste de la particule. X 94000.

Fig. 70. : Fin d'évolution des corps intermédiaires (ct). On note la libération par bourgeonnement de vésicules (◇) limitées par une double membrane. n : nucléoïde, cy : cytoplasme. X 68000.

Fig. 71. : Corps élémentaires de *Porochlamydia buthi pisauri* après purification. Coloration négative par le phosphotungstate de sodium neutre. X 19000.


ct
r
n
ce
68 500nm


m
n
p
ct
69 200nm

n
ct
n
cy
70 250nm

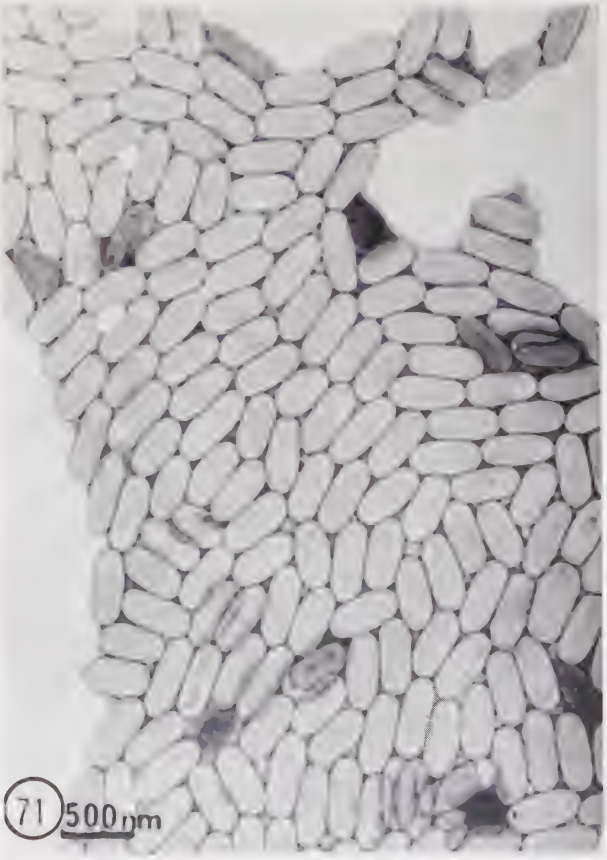

71 500nm

PLANCHE XXVI

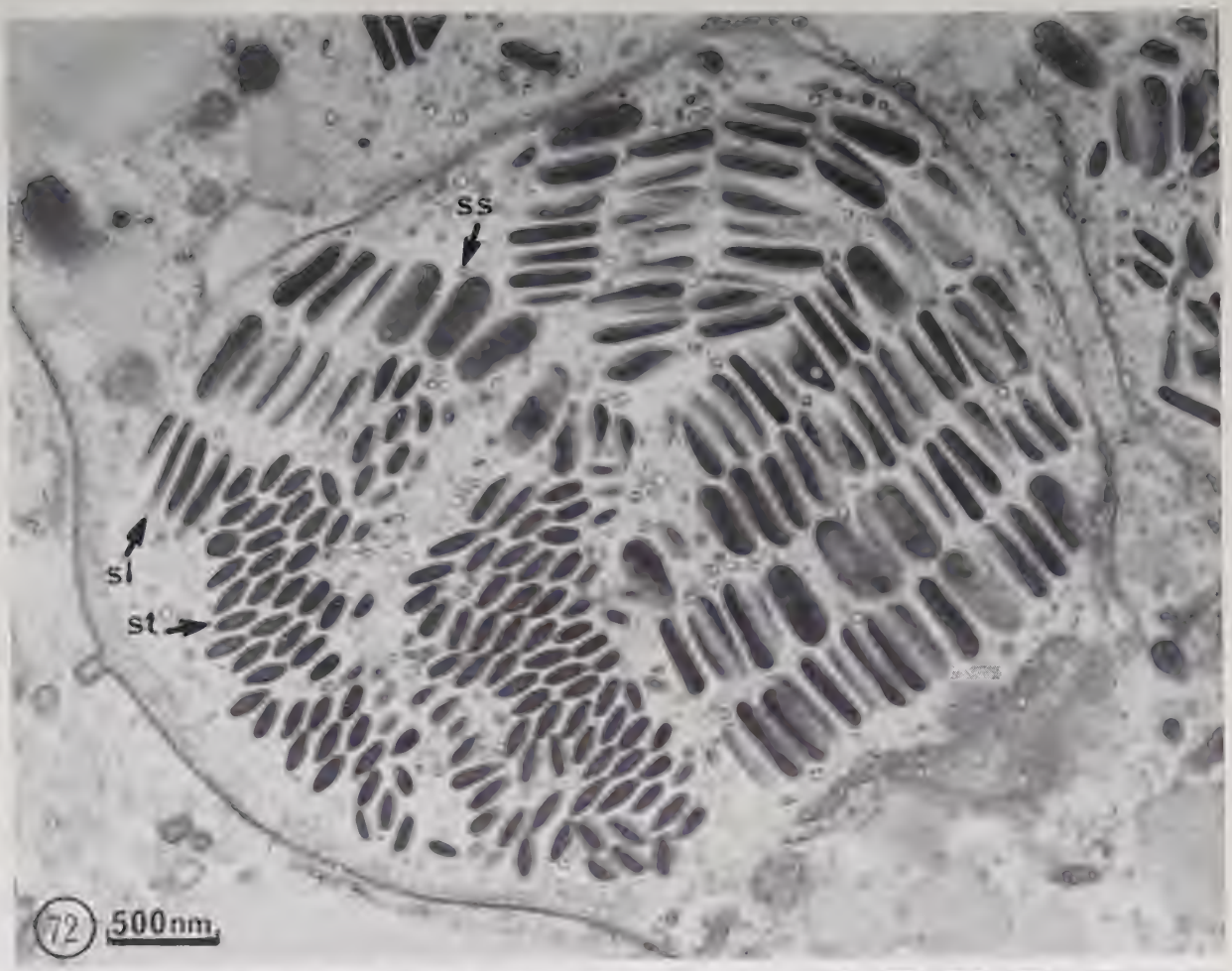
Rickettsiose de *Pisaura mirabilis*.
Porochlamydia buthi pisauri.
Ultrastructure des corps élémentaires.

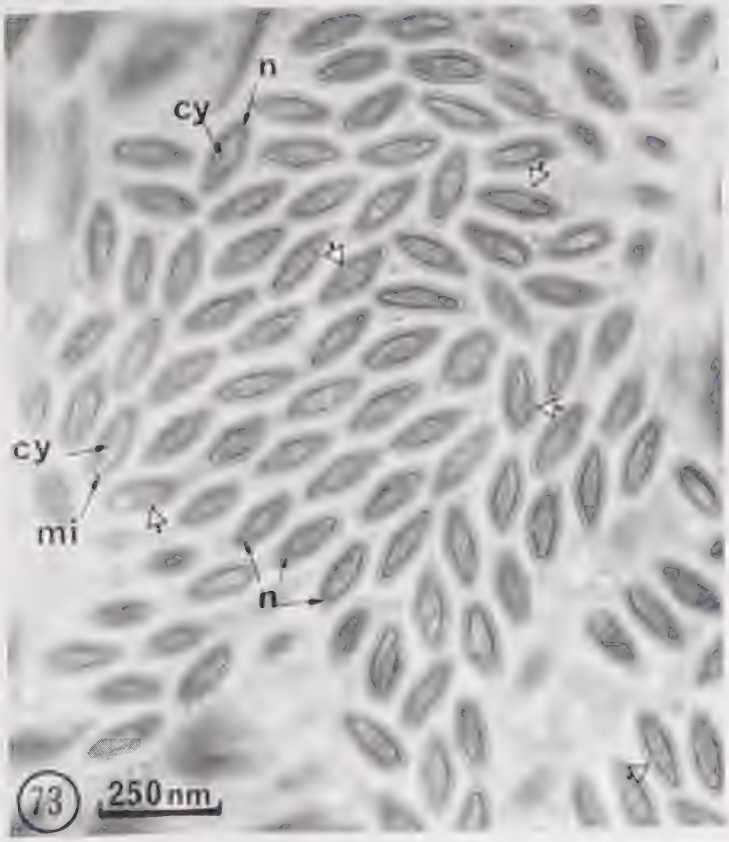
Fig. 72. : Microcolonie âgée de *Porochlamydia buthi pisauri* ne renfermant que des corps élémentaires. Corps élémentaires en section transversale (st), longitudinale (sl), sagittale (ss). X 30000.

Fig. 73. : Corps élémentaires en section transversale. Le nucléoïde (n) périphérique entoure presque totalement le cytoplasme (cy) qui reste en contact en un point (⊣▷) avec les limites cellulaires. mi : système membranaire interne. X 62000.

Fig. 74. : Coupe sagittale d'un corps élémentaire montrant l'arrangement régulier des ribosomes (r). n : nucléoïde. X 72000.

Fig. 75. : Corps élémentaire en réaction longitudinale. La paroi (p) apparait nettement perforée. X 100000.


ss
sl
st
72 500nm


n
cy
cy
mi
n
73 250nm

r
n
74 200nm

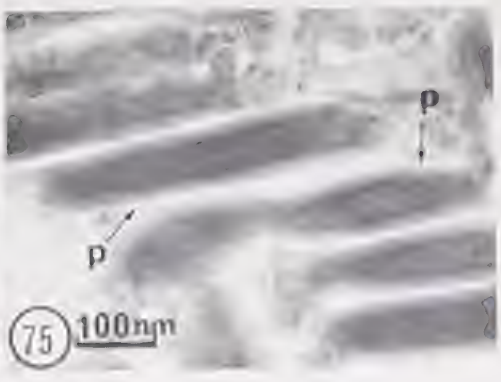

p
p
75 100nm

PLANCHE XXVII

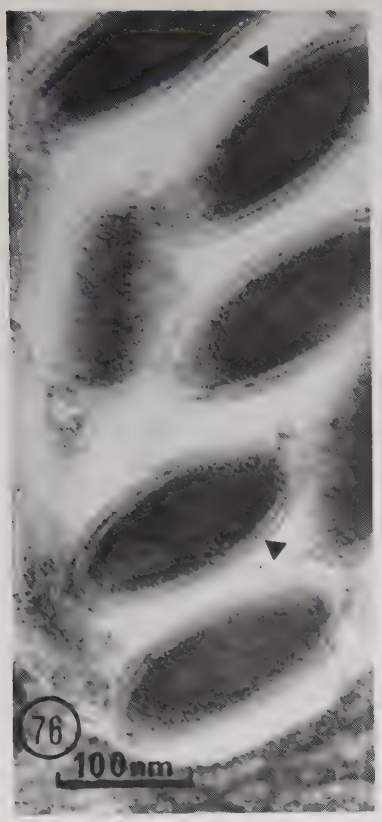
Rickettsiose de *Pisaura mirabilis*.

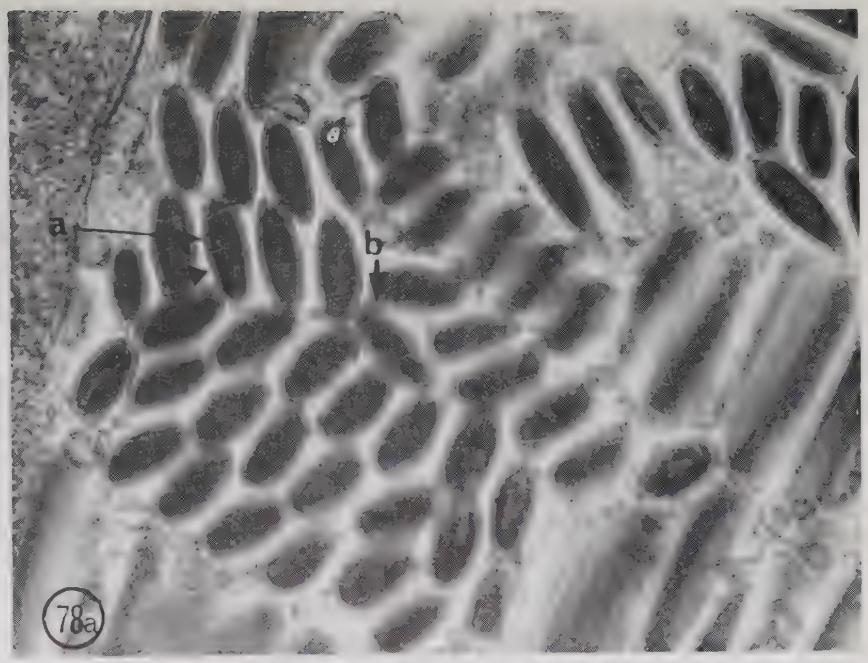
Porochlamydia buthi pisauri.

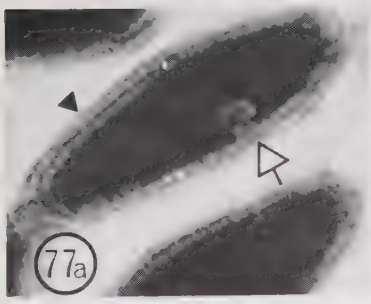
Ultrastructure des corps élémentaires.

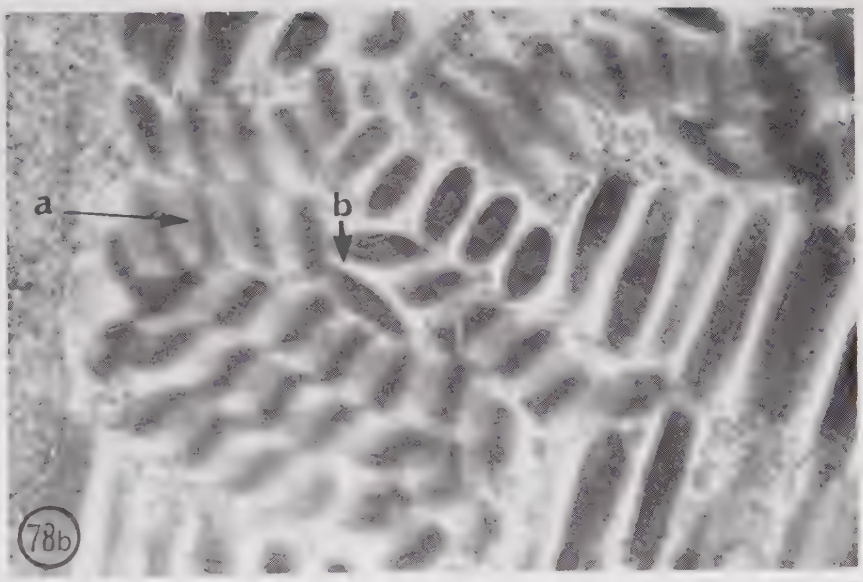
Fig. 76 et 77 a-b : Section transversale de corps élémentaires montrant les perforations au niveau de la paroi (▸). La relation entre le système membranaire interne et la membrane cytoplasmique est visible sur la fig. 77a (⇨). Fig. 76 : X 168000, fig. 77 a-b : X 240000.

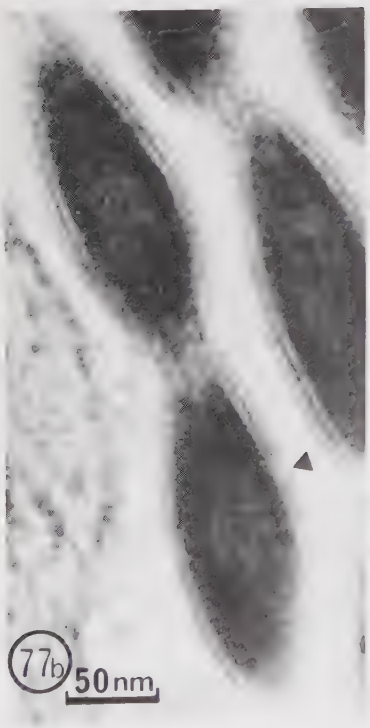
Fig. 78 a-b-c : Clichés d'une portion de microcolonie âgée obtenus par utilisation d'une platine goniométrique. La forme des particules varie en fonction de l'angle d'observation de même que la netteté des structures internes. La particule a n'est nette que sur la fig. 77a ; (➔) paroi a aspect perforé. La particule b n'est nette que sur la fig. 78c. Fig. 78b : tilt 0°, fig. 78a : tilt -25°, fig. 78c : tilt + 25°. X 72000.


76
100nm


a
b
78a


77a


a
b
78b


77b
50nm

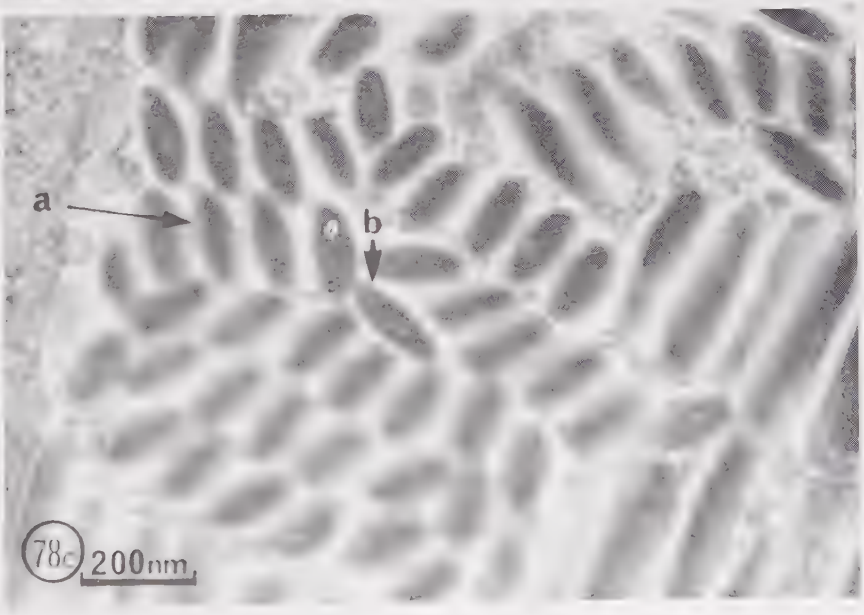

a
b
78c
200nm

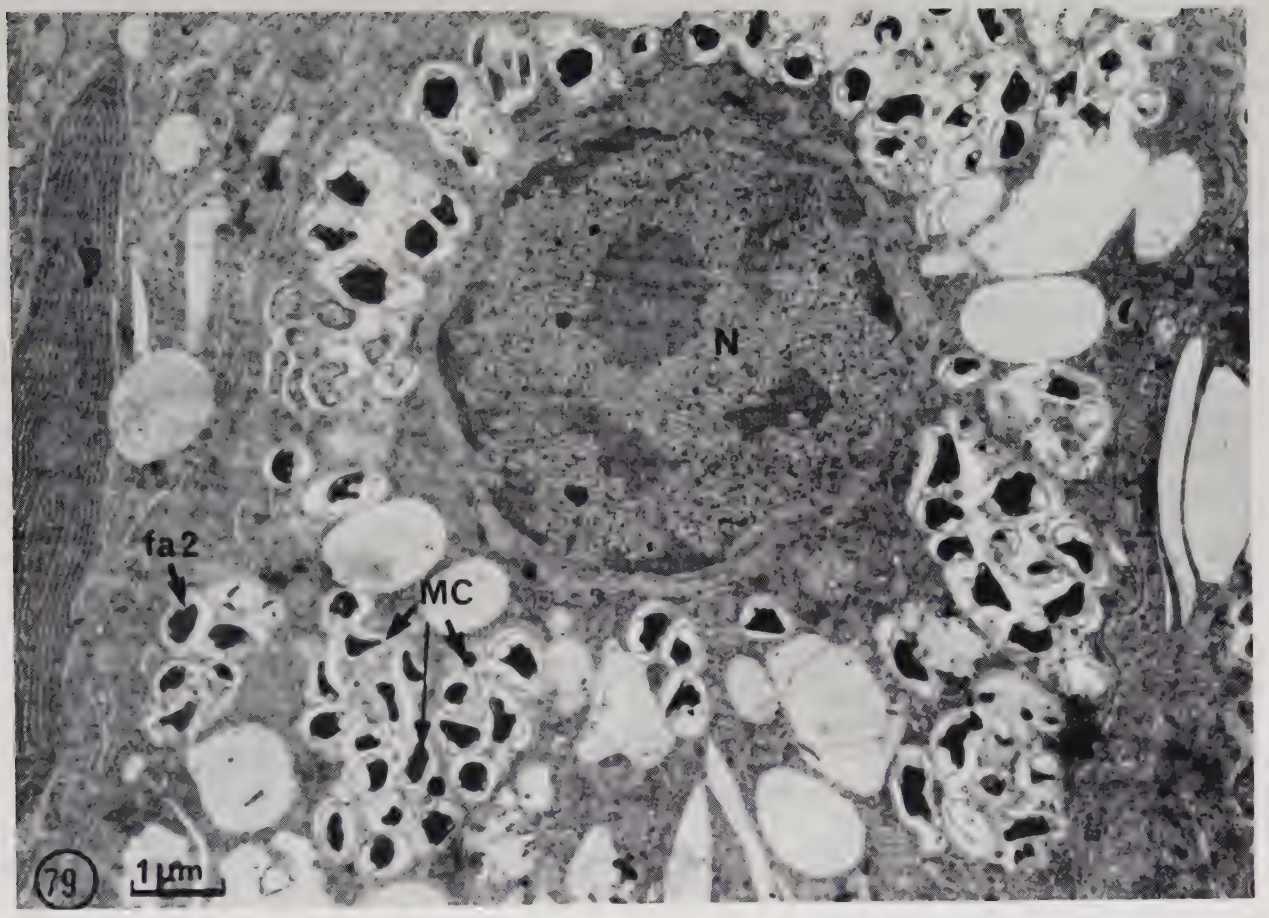
PLANCHE XXVIII

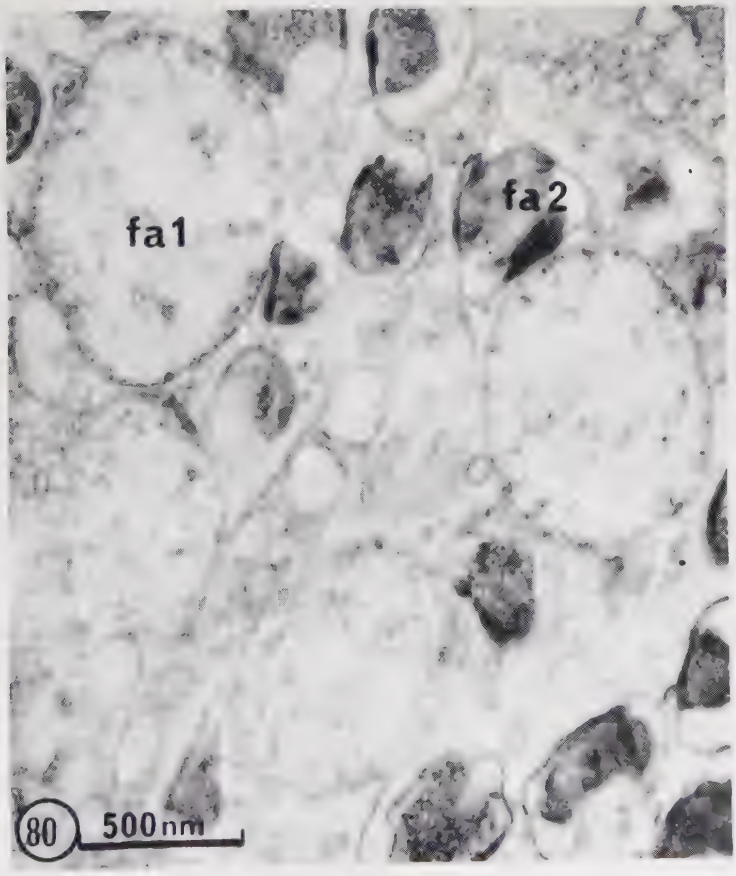
Rickettsiose de *Pisaura mirabilis*.
Porochlamydia buthi pisauri.
Developpement anormal.

Fig. 79. : Cellule à ferment de *Pisaura mirabilis*. Les microcolonies (MC) de *Porochlamydia buthi pisauri*, de petite taille, ne renferment que des formes anormales (fa2). N : noyau de la cellule hôte. X 12000.

Fig. 80. : Détail d'une microcolonie de cellule à ferment. Les corps initiaux anormaux (fa1) sont de grande taille. La structure des formes anormales de petite taille (fa2) rappelle celle des corps élémentaires. X 42000.

Fig. 81. : Formes anormales en fin d'évolution. Les limites cellulaires sont celles des corps élémentaires (→) au contact du nucléoïde latéral (n). On note la présence d'un nombre important de ribosomes (r) dans le cytoplasme. X 68000.


N
fa2
MC
79
1µm


fa1
fa2
80
500nm

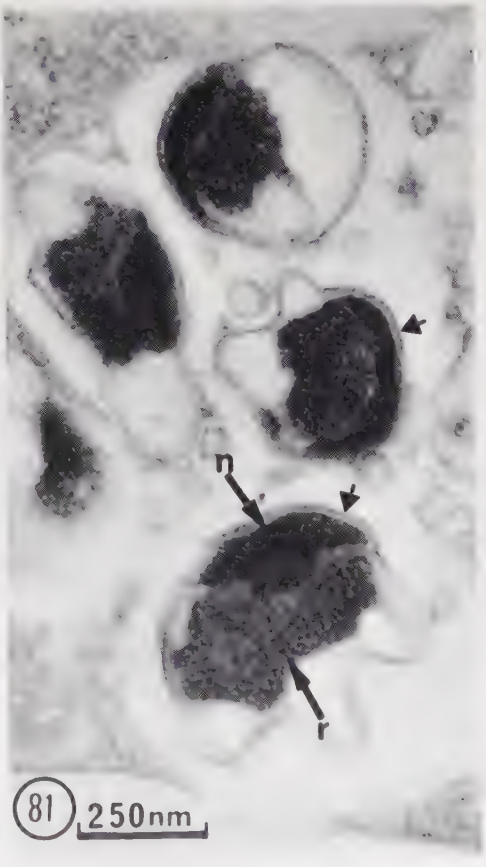

n
r
81
250nm

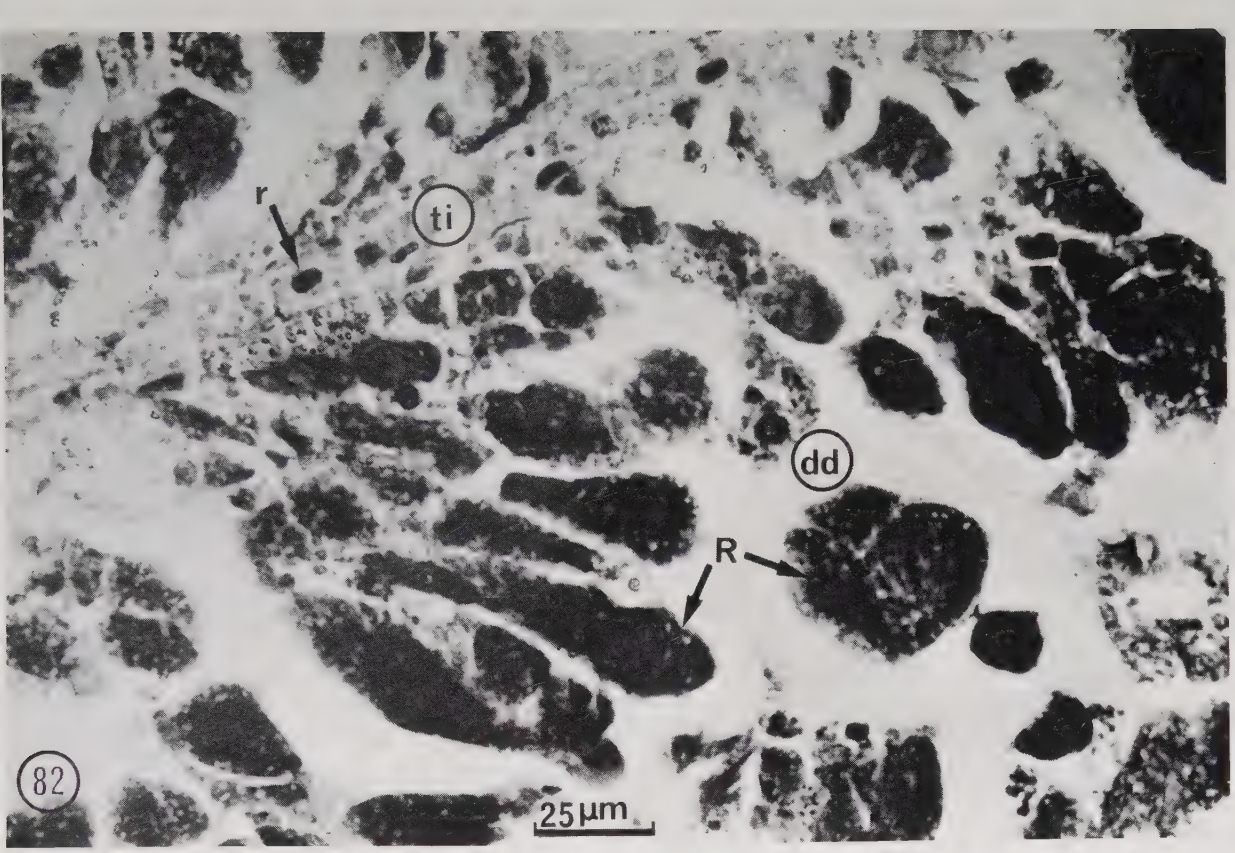
PLANCHE XXIX

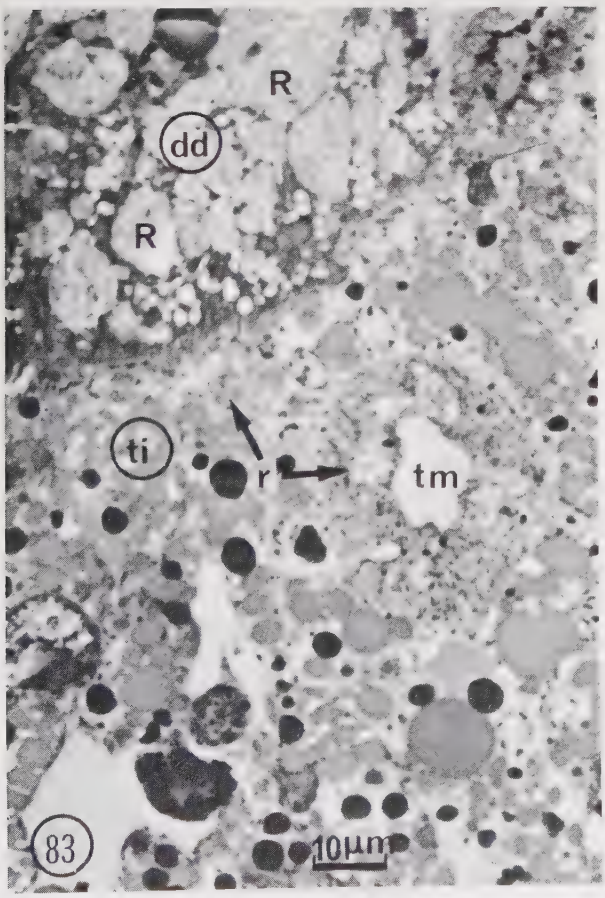
Rickettsiose de *Pisaura mirabilis*.
Porochlamydia piriformis.
Histopathologie.

Fig. 82. : Section d'hépatopancréas de *Pisaura mirabilis* infectée par *Porochlamydia piriformis*. De grandes microcolonies (R) se développent dans les cellules des diverticules digestifs (dd). Le tissu interstitiel (ti) renferme quelques petites microcolonies (r). Coloration de Mann-Dominici. X 625.

Fig. 83. : Coupe semi-fine d'hépatopancréas. Le développement de *Porochlamydia piriformis* se fait préférentiellement dans les cellules des diverticules digestifs (dd), R : microcolonies. De petites colonies (r) se développent dans le tissu interstitiel (ti) et les cellules des tubes de Malpighi (tm). Coloration au bleu de toduidine boraté. X 940.

Fig. 84. : Coupe semi-fine au niveau des cellules digestives. Dans les grandes microcolonies (R), des espaces non colorés correspondent à l'emplacement des cellules rickettsiennes géantes (cg). Coloration au bleu de toluidine boraté. X 940.


r
ti
dd
R
82
25µm


R
dd
R
ti
r
tm
83
10µm

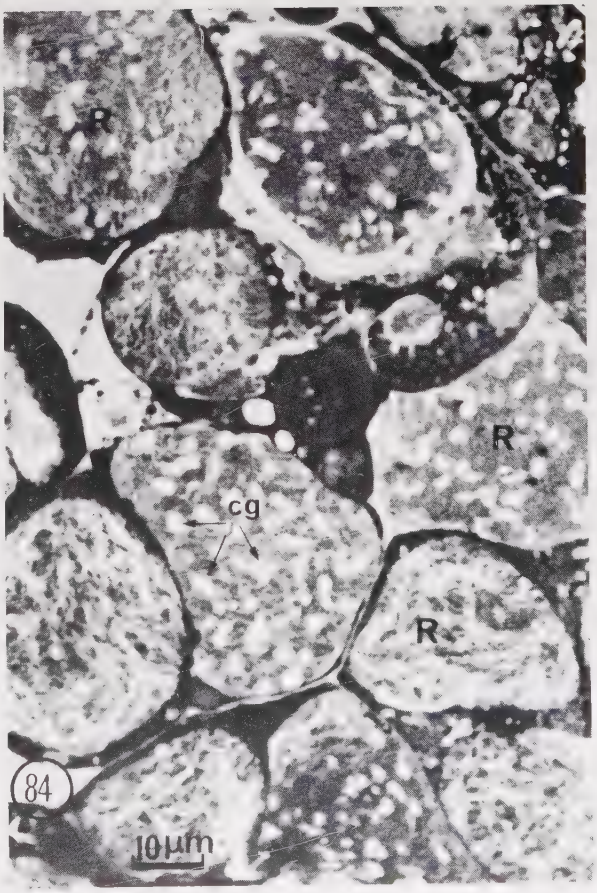

R
R
cg
R
84
10µm

PLANCHE XXX

Rickettsiose de *Pisaura mirabilis*.

Porochlamydia piriformis.

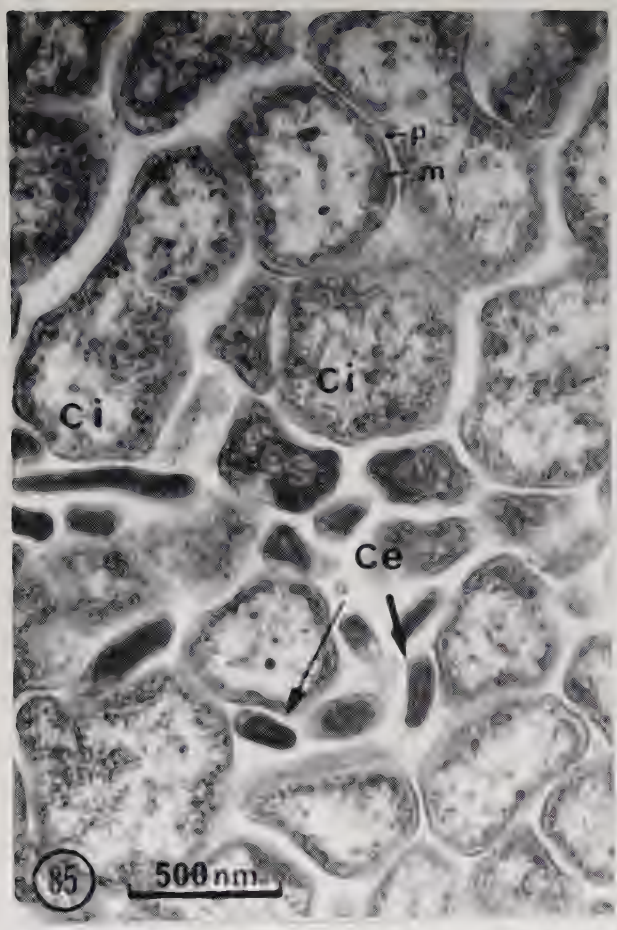
Ultrastructure des corps initiaux et des corps intermédiaires.

Fig. 85. : Dans les vacuoles de développement intactes, les corps initiaux (ci) de *Porochlamydia buthi* exhibent un pléomorphisme important. ce : corps élémentaires, p : paroi, m : membrane cytoplasmique. X 140000.

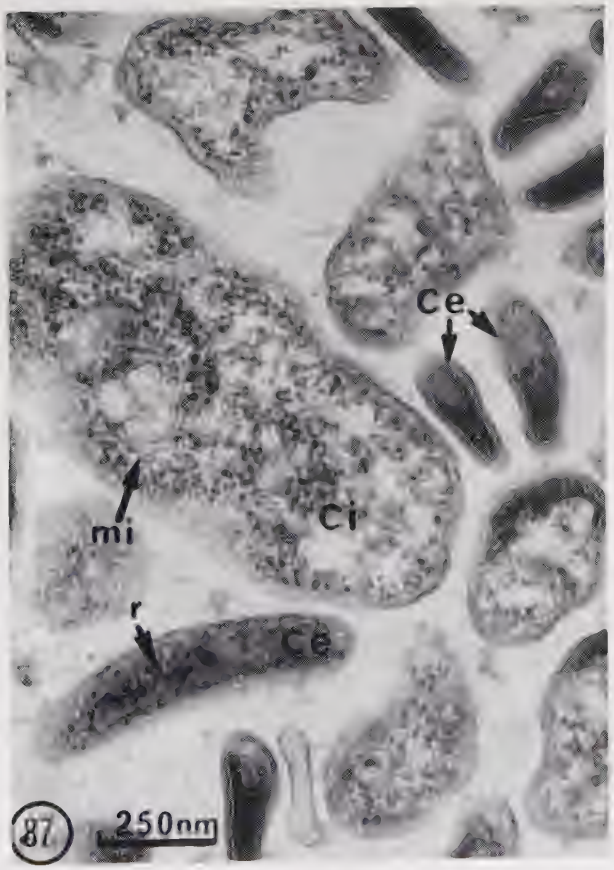
Fig. 86. : Aspects des microorganismes à la suite d'une lésion de la membrane de la vacuole de développement. Les corps initiaux ci 1,2,3,4, sont sphériques. Le volume des corps initiaux 1 représente la moitié de celui des corps initiaux 2, le quart de celui des corps initiaux 3 et le huitième de celui des corps initiaux 4. ce : corps élémentaires. X 20000.

Fig. 87. : Corps initial (ci) montrant l'existence d'un système membranaire interne (mi). Les corps élémentaires (ce) renferment des ribosomes (r) régulièrement alignés. X 60000.

Fig. 88. : Corps intermédiaires (ct). La restructuration des limites cellulaires se produit au niveau du nucléoïde latéral (n). Une constriction (➔) apparaît généralement au cours de la transformation des corps intermédiaires. On remarque l'aspect perforé de la paroi (➪) d'un corps élémentaire (ce). X 60000.


p
m
Ci
Ci
Ce
85
500nm

2
2
3
4
Ct
2
2
1
1
Ci
2
2
Ce
86
1µm


Ce
mi
Ci
r
Ce
87
250nm

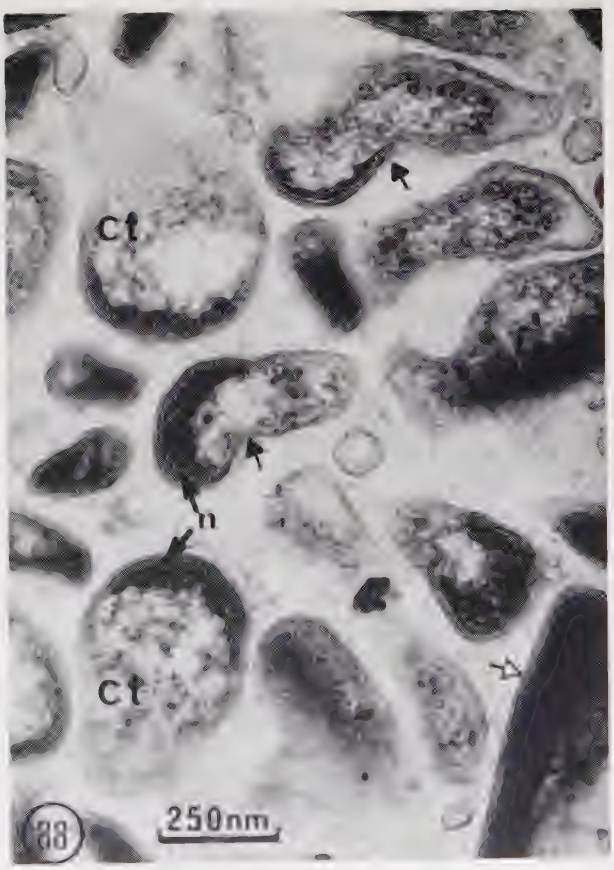

Ct
n
Ct
88
250nm

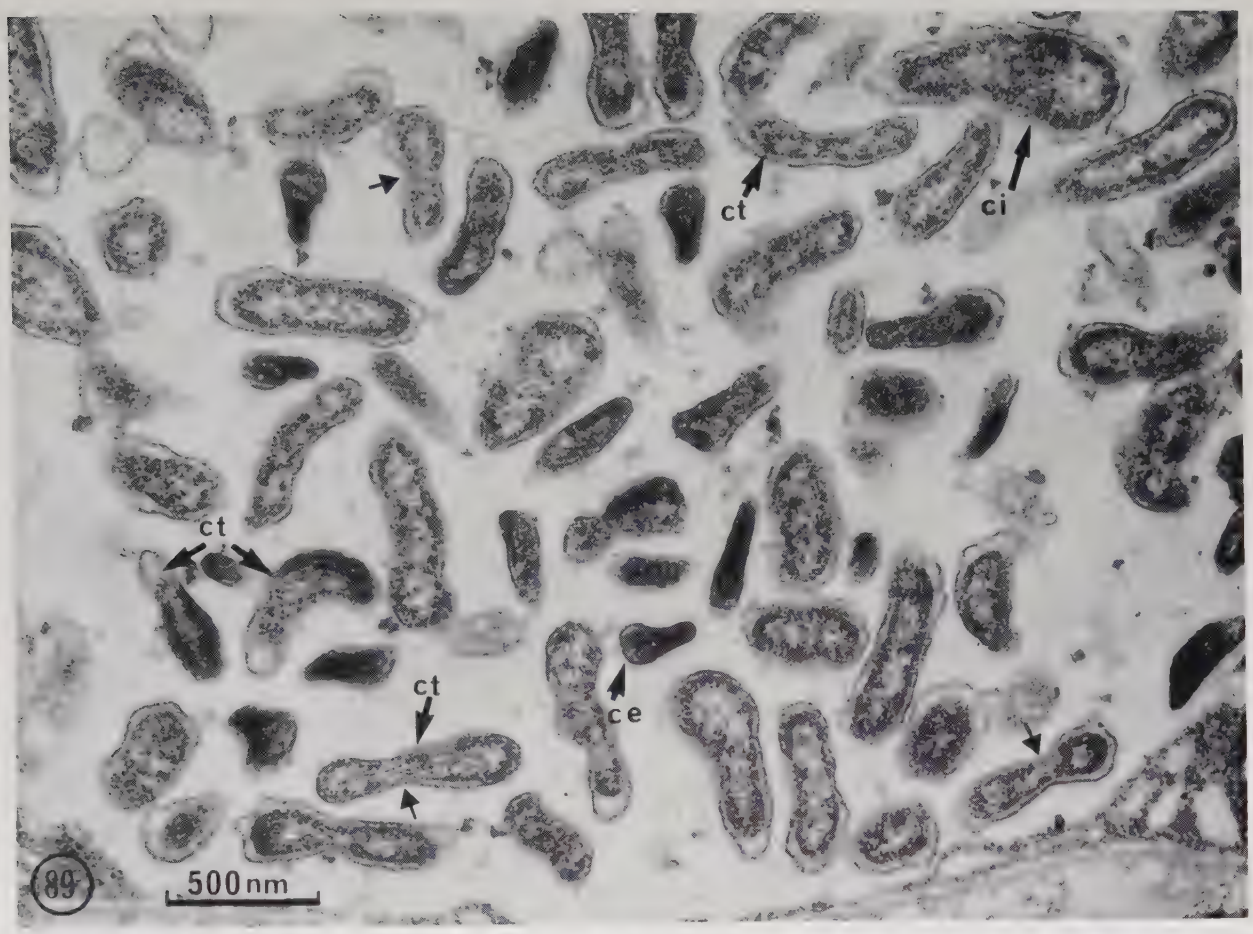
PLANCHE XXXI

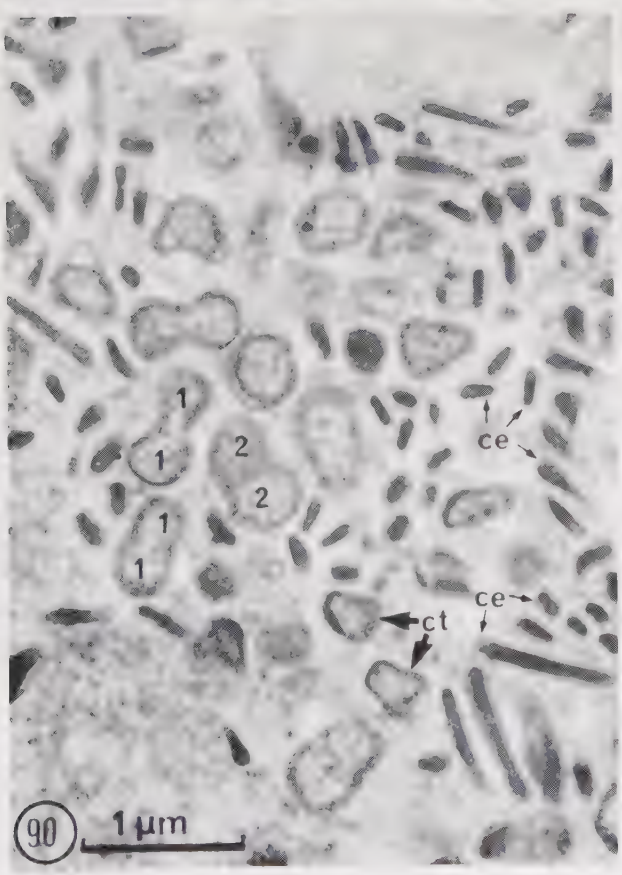
Rickettsiose de *Pisaura mirabilis*.
Porochlamydia piriformis.
Ultrastructure des corps intermédiaires et des corps élémentaires.

Fig. 89. : Au cours de la transformation des corps initiaux (ci) en corps élémentaires (ce), les corps intermédiaires présentent une constriction (➔) surtout nette au début de leur transformation. X 40000.

Fig. 90. : Vacuole âgée de *Porochlamydia piriformis* renfermant de nombreux corps élémentaires (ce) en compagnie de corps intermédiaires (ct) et des plus petits des corps initiaux (1,2) en voie de division. X 21000.

Fig. 91. : Corps élémentaires obtenus par purification en gradient de densité. La zone non contrastée (zc) correspond à la région occupée par le cytoplasme. Un dépôt de phosphotungstate de sodium se fait au-dessus de la région occupée par le nucléoïde (zn). Le système membranaire interne apparaît sous une forme lenticulaire (mi). X 36000.


ct
ci
ct
ct
ce
89
500nm


1
1
2
2
1
1
ce
ce
ct
90
1µm

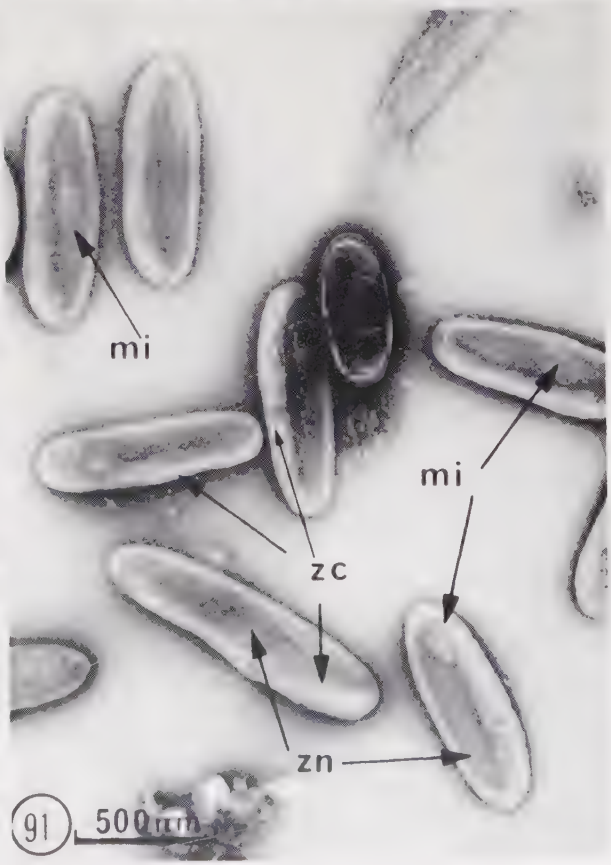

mi
mi
zc
zn
91
500nm

PLANCHE XXXII

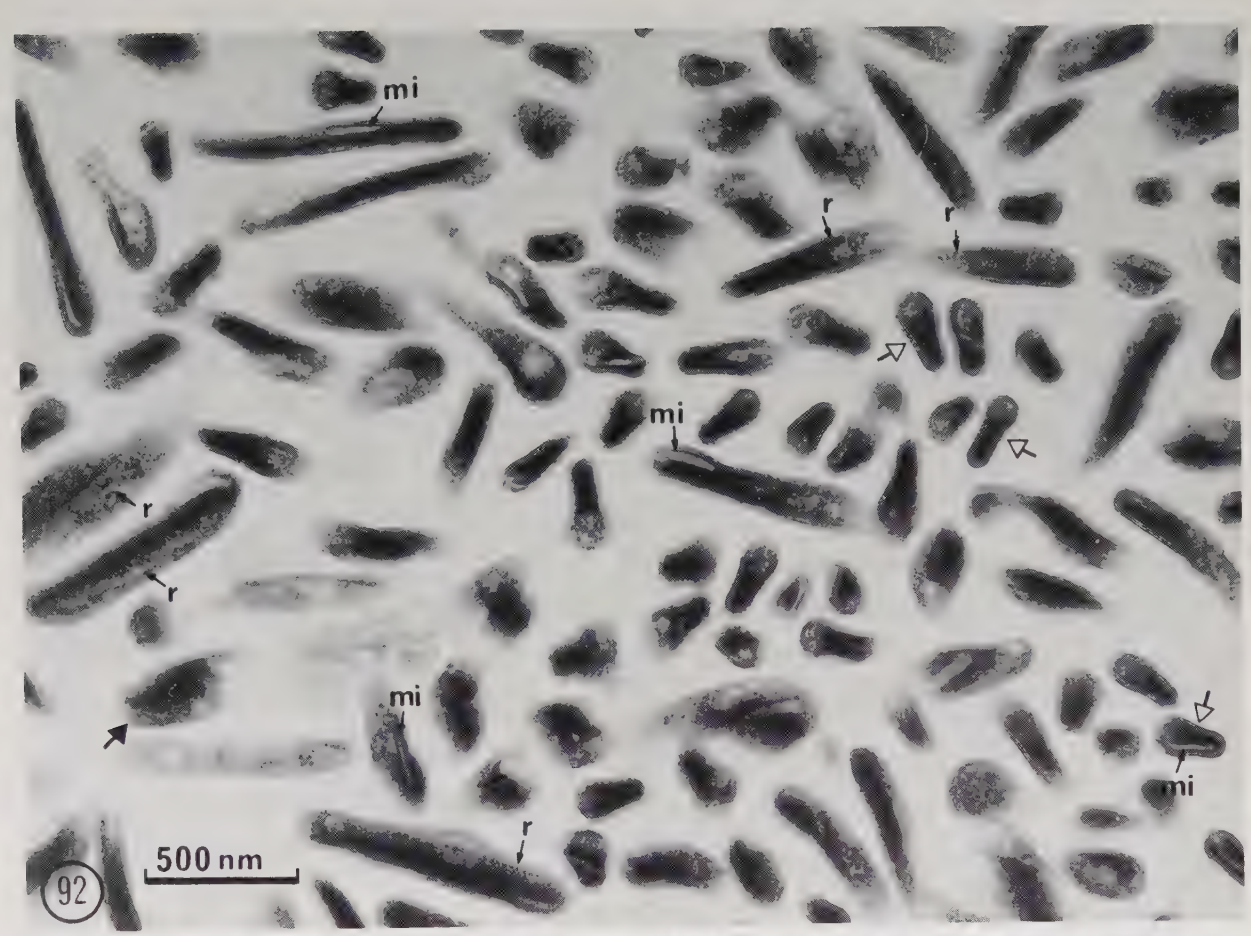
Rickettsiose de *Pisaura mirabilis*.

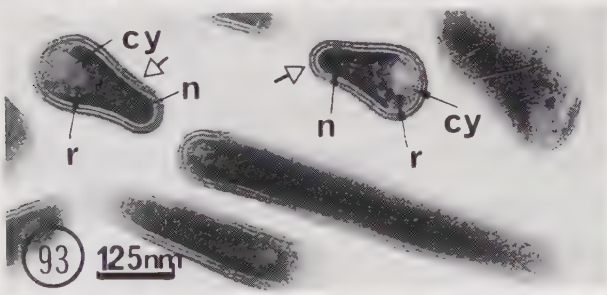
Porochlamydia piriformis.

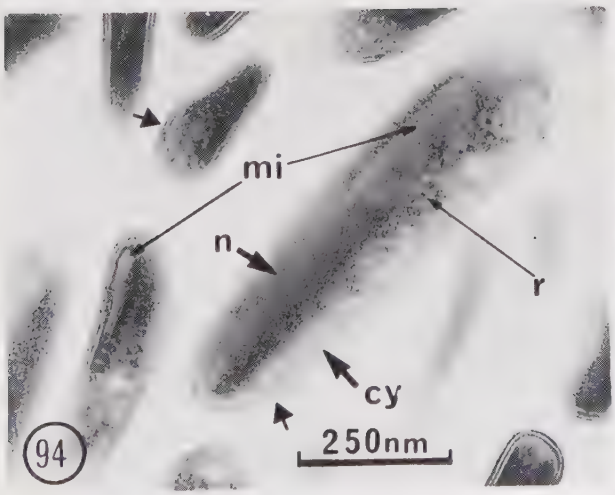
Ultrastructure des corps élémentaires et des corps géants.

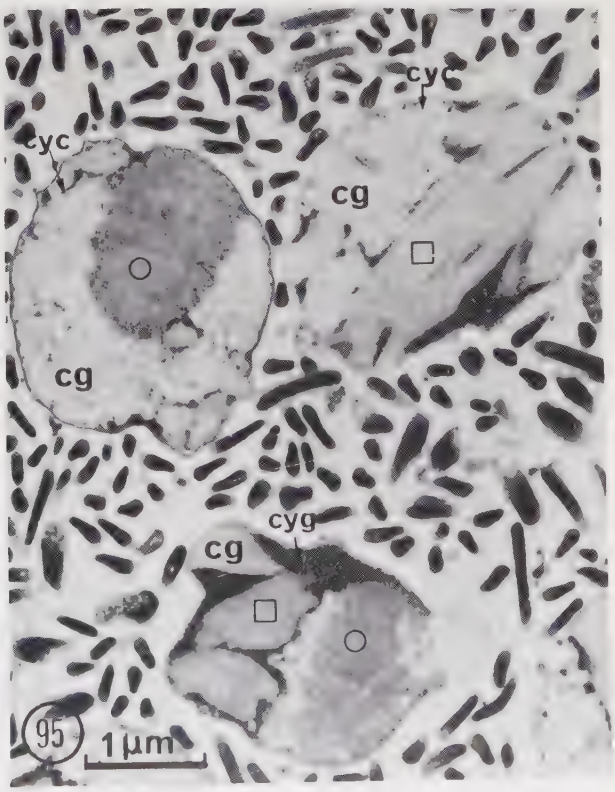
Fig. 92, 93 et 94. : Section de microcolonie âgée ne renfermant que des corps élémentaires. Le système membranaire interne (mi) et les ribosomes (r) sont nettement visibles. Les sections transversales de ces corps sont généralement piriformes (⇨). Le nucléoïde (n) occupe la partie étroite des particules et le cytoplasme (cy) la partie large. Les parois n'ont un aspect perforé que sur une très faible portion. Limites cellulaires (→).

Fig. 95. : Portion d'une microcolonie âgée renfermant de très nonbreux corps élémentaires et des corps géants (cg). Outre un cytoplasme clair (cyc) ou granulaire (cyg), les corps géants renferment un matériel légèrement dense aux électrons, composé de fibres disposées selon un arrangement paracristallin (o). □ fibres sectionnées longitudinalement. X 16000.


mi
r
r
mi
r
r
mi
mi
r
500 nm
92


cy
n
r
n
cy
r
93
125nm


mi
n
r
cy
94
250nm


cyc
cyc
cg
cg
cyg
cg
95
1 µm

CHAPITRE VII

ETUDES COMPARATIVES DES RICKETTSIES ISOLEES CHEZ *BUTHUS OCCITANUS* AM. ET *PISAURA MIRABILIS* CL. ET DISCUSSIONS RELATIVES A CES MICROORGANISMES

La recherche systématique de maladies infectieuses chez l'araignée *P. mirabilis* et chez le scorpion *B. occitanus* a permis de mettre en évidence dans les populations de ces prédateurs quatre rickettsies ce qui porte à 6 le nombre des rickettsioses connues dans ce groupe d'invertébrés. Les procaryotes intracellulaires isolés dont certains appartiennent à un nouveau genre : le genre *Porochlamydia*, montrent une hétérogénéité quant à leurs sites de développement, leur évolution au cours du cycle de multiplication et leur pouvoir pathogène.

Nous avons complété nos connaissances sur ces divers procaryotes par une série d'études comparatives afin de préciser leur ultrastructure, leur spécificité et leurs relations antigéniques.

Les possibilités de comparaison offertes par le développement chez un même hôte et chez des hôtes différents de ces microorganismes voisins, si l'on considère leur mode de multiplication, va nous permettre d'apporter des éléments de réponse à quelques uns des problèmes concernant ce type de microorganismes chez les invertébrés. Cette discussion étendue à l'ensemble des rickettsioses, dont l'agent a un cycle intracellulaire, portera en particulier sur les affinités existantes entre les *Rickettsiella*, les *Porochlamydia* et les *Chlamydia*, sur les formes aberrantes que sont les corps géants et sur le pouvoir pathogène de ces germes.

I - ETUDE COMPAREE PAR CRYODECAPAGE ET TESTS CYTOCHIMIQUES DE *POROCHLAMYDIA BUTHI BUTHI* ET DE LA *RICKETTSIELLA* DE *PISAURA MIRABILIS*.

L'impossibilité de cultiver sur milieu artificiel ces deux microorganismes ne permet pas l'étude approfondie de leur métabolisme

ni l'analyse biochimique de leurs divers constituants. Afin de vérifier nos interprétations des coupes fines et de rechercher d'autres éléments caractérisant ces germes, nous avons procédé (Louis et coll. sous presse) à leur étude par cryodécapage et utilisé un certain nombre de tests cytochimiques.

1 - Etude cytochimique.

a) *"Coloration régressive" des acides nucléiques par l'E.D.T.A.*

Cette coloration révèle les structures ribonucléoprotéiques , l'E.D.T.A. décolorant les structures composées d'acide désoxyribonucléique. Dans les corps élémentaires de la *Rickettsiella* (Pl. XXXIII, Fig. 96), l'éclaircissement se produit tout d'abord dans la zone centrale des particules. Dans la périphérie, les granules, précédemment assimilés à des ribosomes, restent colorés. Chez *P. buthi* (Pl. XXXIII, Fig. 97), l'inverse est observé. Les granules régulièrement alignés dans la zone centrale restent colorés et c'est la zone périphérique qui se décolore.

Pour les corps initiaux, les fibrilles composant le nucléoide plus ou moins différencié selon les germes s'estompent partiellement sous l'action prolongée de l'E.D.T.A. (plus de 30 mn).

Dans les corps intermédiaires, l'action de l'E.D.T.A. est identique à celle notée pour les corps élémentaires.

La "coloration régressive" par E.D.T.A. confirme donc la répartition dans les corps élémentaires du matériel cytoplasmique et du matériel nucléaire que nous avions proposé précédemment pour les deux microorganismes.

b) *Fixation au permanganate de potassium.*

Cette fixation entraîne un gonflement des corps élémentaires aussi bien chez *P. buthi* que chez la *Rickettsiella*. L'ADN dense

aux électrons après la double fixation (glutaraldéhyde-acide osmique) n'est plus coloré après fixation au permanganate de potassium. Dans les corps élémentaires de *P. buthi* (Pl. XXXIII, Fig. 99), la zone périphérique est claire aux électrons sauf en un point où la masse cytoplasmique centrale rejoint l'enveloppe. Chez ceux de la *Rickettsiella* (Pl. XXXIII, Fig. 98) c'est la zone centrale qui est éclaircie ; il y subsiste cependant des fibres longitudinales denses en liaison avec le cytoplasme latéral.

La fixation au permanganate confirme donc comme l'avait fait la "coloration régressive" à l'E.D.T.A., l'inversion de la répartition matériel nucléaire-cytoplasme chez *P. buthi* au cours du cycle. Elle met cependant en évidence l'existence d'un passage à travers le nucléoïde permettant au cytoplasme d'être en contact avec les limites cellulaires. Ce contact est vraisemblablement constitué par le système membranaire interne.

c) Digestion à la pronase.

Cet essai de digestion enzymatique, à l'aide d'une protéase, du matériel contenu dans les corps géants de la *Rickettsiella* a donné un résultat négatif. Ce résultat est comparable à celui noté chez *R. armadillidii* par Louis et coll. (1977 b) et contraste donc avec le résultat positif obtenu avec les corps géants de *R. grylli* (Louis et coll. 1977 a).

2 - Etude par cryodécapage.

Sur les fractures traversant les vacuoles de développement (PL. XXXIII, Fig. 100 ; Pl. XXXIV, Fig. 105), la forme des différentes particules rencontrées confirme la morphologie précédemment déterminée d'après les coupes pour les différents stades tant pour la *Rickettsiella* que pour *P. buthi*. La structure interne des microorganismes n'est pas mise en évidence sauf chez la *Rickettsiella* : dans les corps élémentaires de cette dernière, une protubérance en forme de cône est visible au niveau de l'emplacement théorique du nucléoïde. Les fractures des corps

géants se composent de trois zones : une zone granulaire périphérique entourant une région entièrement lisse et une zone composée de granules disposés en alignements parallèles.

Le clivage de l'enveloppe des rickettsies se fait préférentiellement au niveau de la membrane plasmique (Pl. XXXIII, Fig. 100 à 105 ; Pl. XXXIV, Fig. 105, 107), entre les deux feuillets phospholipidiques selon les caractéristiques définies par Branton et coll. (1975). Les faces P sont habituellement convexes et les faces E concaves.

Les diverses surfaces observées montrent en outre l'existence de petites particules dont la densité et le nombre pour les divers stades sont reportés sur le tableau suivant (Tableau I).

Tableau I

Densité (d) et nombre (n) des granules sur les surfaces de clivage de *Rickettsiella sp.* et de *P. buthi buthi*.

	Clivage de la membrane cytoplasmique				Clivage de la paroi	
	Face E		Face P		Face concave	Face convexe
	d : n/µm²	n	d : n/µm²	n	n	n
Rickettsiella sp.						
Corps initiaux	850	1700	4300	9000	9000	rares
Corps élémentaires	500	200	6100	2600	9000	rares
Corps géants	770	2400 à 9600	3600	11000 à 45000	9000	rares
P. buthi buthi						
Corps initiaux	300	250 à 500	3200	3000 à 6000	rares	rares
Corps élémentaires	-	-	6100	2000	Pas de clivage exploitables.	

Sur les clivages de la membrane cytoplasmique, on constate, chez les deux microorganismes, une augmentation de la densité des particules de la face concave lors de la transformation des corps initiaux en corps élémentaires ; variation identique à celle noté chez *R. armadillidii* (Louis et coll. 1977 b). Les corps géants, eux montrent une diminution de la densité en particules pour la même face. Chaque stade se différencie donc par sa concentration en particules intramenbranaires.

Les clivages des parois (Pl. XXXIII, Fig. 102,103 ; Pl. XXXIV, Fig. 105,107) sont plus rares chez les deux microorganismes. Les faces à peu près lisses de *P. buthi* contrastent avec celles de la *Rickettsiella* qui sont, elles, semblables à celles des bactéries gram-négatif (Bayer et Remsen, 1970 ; Li et Fox, 1975). Aucun clivage de paroi exploitable n'a été obtenu pour les corps élémentaires de *P. buthi ;* il est possible que cela soit lié aux discontinuités observées à ce niveau sur coupes ultrafines.

Les caractéristiques des clivages de la membrane plasmique et de la paroi de *Rickettsiella sp.* restent les mêmes à chaque phase du cycle et correspondent à celles des bactéries gram-négatif (Bayer et Remsen, 1970 ; Li et Fox, 1975) et de *Rickettsiella armadillidii* (Louis et coll., 1977 b). Pour *Porochlamydia buthi,* les caractéristiques des clivages sont différentes de celles des bactéries gram-négatif. Il y a d'une part une quasi-absence de granules sur les clivages concaves de la paroi des corps initiaux, d'autre part, les corps élémentaires montrent à la fois une quasi-absence de granules sur la face E de la membrane plasmique et ne sont pas vraisemblablement clivés au niveau de la paroi. Ces deux derniers points confirment le caractère très particulier noté sur coupe de la paroi des corps élémentaires de *P. buthi*.

II - ETUDE DE LA SPECIFICITE D'HOTE DES RICKETTSIES ISOLEES CHEZ *BUTHUS OCCITANUS* AM. ET *PISAURA MIRABILIS* CL. ET DISCUSSION SUR CETTE SPECIFICITE ET LA SPECIFICITE CELLULAIRE.

L'importance des similitudes notées entre *P. buthi buthi* et *P. buthi pisauri* et entre *Rickettsiella sp.* chez l'araignée *Pisaura*

mirabilis et les autres *Rickettsiella* des arthropodes, nous a conduit à étudier par des séries d'infections croisées la spécificité d'hôte des germes que nous avons isolés.

Les résultats des diverses infections réalisées sont les suivants :

- L'ingestion par le scorpion *B. occitanus* des trois microorganismes de l'araignée n'est suivit d'aucune multiplication des germes. Il en est de même lorsque *P. buthi buthi* est ingérée par l'araignée *P. mirabilis* ou inoculé à cette dernière.

- Les essais de transmission des quatre rickettsioses à l'araignée *Micrommata virescens* que l'on trouve souvent dans les mêmes stations que *P. mirabilis*, ont également été négatifs.

- Au sein de l'ordre des scorpions, un léger développement de *P. buthi buthi* a pu être constaté chez deux des 13 espèces et sous-espèces contaminées. Ce développement est limité à quelques cellules de l'hépatopancréas et n'entraîne pas la mort des animaux. Les deux scorpions où la rickettsie se développe sont *Buthacus leptochelys* et la sous-espèce *Buthus occitanus ssp. tunetanus*. L'absence de développement a été constatée chez : *Rhopalurus laticauda, Paruroctonus aquilonalis, Diplocentrus spitzeri, Tityus clathratus, Tityus discrepans, Scorpio maurus, Androctonus australis, Androctonus amoreuxi, Cicileus exilis, Buthus occitanus ssp. mardochei* et *Euscorpius flavicaudis*.

Des essais de transmission des rickettsioses d'arachnides à des insectes ont été tentés sur *Galleria mellonella* (Lepidoptère). *Acheta domestica* (Orthoptère) et *Melonlontha melolontha* (Coléoptère). Aucun développement des rickettsies provenant des arachnides n'a été constaté et de même, les rickettsies d'insectes *R. grilly* et *R. melolonthae* ne se développent ni chez *B. occitanus*, ni chez *P. mirabilis*.

La spécificité d'hôte des microorganismes isolés est donc importante. Si l'on considère *P. buthi buthi* avec qui nous avons procédé aux plus nombreux essais, la spécificité est restreinte à certaines sous-espèces de *Buthus occitanus*. Cependant un léger développement se produit chez une espèce voisine et traduit donc une certaine faculté d'adaptation du microorganisme.

Discussion.

Le développement intracellulaire obligatoire des microorganismes implique qu'ils sont dépendants des cellules hôtes au moins pour une partie de leur métabolisme. Le degré de dépendance des germes va donc se traduire par une gamme plus ou moins étendue des types cellulaires et des organismes capables de survenir à leurs besoins.

Les données bibliographiques et nos observations personnelles concernant les sites de développement des *Rickettsiella* et des *Porochlamydia* dans les arthropodes hôtes ainsi que ces arthropodes sont reportés sur le tableau II.

D'après ce tableau, les informations relatives à la spécificité cellulaire peuvent être résumées ainsi :

- deux tissus sont systématiquement attaqués par les microorganismes : le tissu adipeux chez les insectes et les crustacés et l'hépatopancréas chez les arachnides ;
- la plupart des *Rickettsiella* se développent en outre dans de nombreux types cellulaires : hémocytes, cellules hypodermiques, cellules des tubes de Malpighi ;
- le développement des *Porochlamydia* localisé à l'hépatopancréas pour *P. buthi buthi* et *P. buthi pisauri* s'étend à certaines cellules du tissu interstitiel et aux tubes de Malpighi pour *P. piriformis*.

Le degré de spécificité diffère donc pour les *Rickettsiella* et les *Porochlamydia ;* les *Rickettsiella* paraissent moins spécifiques d'un type cellulaire particulier que les *Porochlamydia* et sont donc vraisemblablement moins dépendantes que ces dernières du métabolisme cellulaire.

Les données relatives à la spécificité d'hôte indiquent que la plupart des *Rickettsiella* peuvent se développer chez les insectes voisins de l'hôte d'origine et même chez les insectes appartenant à des genres différents. Les *Porochlamydia* en revanche, malgré le faible nombre d'essais de transmission réalisé semblent beaucoup plus spécifiques. Si l'on considère *P. buthi buthi* pour qui l'étude la plus importante a été faite,

MICROORGANISMES	HOTES D'ORIGINE	HOTES EXPERIMENTAUX	SITES DU DEVELOPPEMENT INTRACELLULAIRE					
			TA ou TI	HY	HE	HP ou IM	TM	Divers
Rickettsiella sp. (3)	Amphipodes	-	-	+	-	-	-	-
Rickettsiella sp. (7)	Lepidopteres	Coléoptères ++	+	-	-	-	-	-
Rickettsiella sp. (1, 13)	Coléoptères	Coléoptères + Diptères +	+	0	0	0	0	0
Rickettsiella sp. (11)	Araneides	-	-	-	-	+	-	-
Rickettsiella sp. (●)	Araneides	Scorpions 0 insectes 0	+	0	0	+	+	Glandes salivaires, Glandes à venin.
R. popilliae (2)	Coléoptères	Coléoptères +	+	-	-	-	-	-
R. tenebrionis (9)	Coléoptères	-	+	-	-	-	-	-
R. tipulae (5)	Diptères	-	+	+	0	0	0	Cellules nerveuses
R. grylli (14)	Orthoptères	Orthoptères + Coléoptères + Lépidoptères +	+	+	+	+	+	Glandes salivaires.
R. schistocercae (15)	Orthoptères	Orthoptères +	+	+	+	0	0	0
R. cetonidarum (10)	Coléoptères	Orthoptères + Coléoptères + Lépidoptères +	+	+	+	0	0	0
R. blattae (6)	Orthoptères	-	+	+	+	0	+	0
R. melolonthae (8)	Coléoptères	Coléoptères +	+	0	+	+	+	0
R. armadillidi (16, 18)	Isopodes	Isopodes +	+	0	0	0	0	0
R. chironomi (4, 17)	Diptères	-	+	0	0	0	0	0
Porochlamydia sp. (12)	Aranéides	-	-	-	-	+	-	-
P. buthi buthi (●)	Scorpions	Scorpions (+) Aranéides 0 Insectes 0	0	0	0	+	0	0
P. buthi pisauri (●)	Aranéides	Aranéides 0 Scorpions 0	0	0	0	+	0	0
P. piriformis (●)	Aranéides	Aranéides 0 Scorpions 0	(+)	0	0	+	(+)	0

Légendes : + : développement
0 : absence de développement
- : absence de données
(+) : faible développement

Tissu adipeux : TA ou
Tissu interstitiel : TI
Hypoderme : HY
Hémocytes : HE
Hépatopancréas : HP ou
Intestin moyen : IM
Tubes de Malpighi : TM
Autres tissus : Divers.

1 Carter et Luff, 1976
2 Dutky et Gooden, 1952
3 Federici et coll., 1974
4 Götz, 1972
5 Huger, 1959
6 Huger, 1964
7 Kellen et coll., 1972
8 Krieg, 1964
9 Krieg, 1965
10 Meynadier et Monsarrat, 1969
11 Meynadier et coll., 1974
12 Osaki, 1973
13 Sutter et Kirk, 1968
14 Vago et Martoja, 1963
15 Vago et Meynadier, 1965
16 Vago et coll., 1970
17 Weiser et Zizka, 1968
18 Yousfi, 1976

● Observations personnelles.

TABLEAU II : SPECIFICITE CELLULAIRE ET SPECIFICITE D'HOTE DE PROCARYOTES INTRACELLULAIRES D'INVERTEBRES.

un faible développement du microorganisme n'a pu être observé que chez deux Buthidae parmi les 13 espèces et sous-espèces infectées. Au sein de l'espèce *Buthus occitanus* même, au moins chez une sous-espèce (*B. occitanus mardochei*), le microorganisme ne se développe pas.

Le développement limité à quelques cellules chez *Buthacus leptochelys* et chez *B. occitanus tunetanus* suggère cependant que sur un grand nombre de formes infectieuses, quelques unes sont capables de se développer dans des cellules différentes des cellules hôtes habituelles. Il n'est donc pas exclu de pouvoir sélectionner des souches de *P. buthi buthi* pathogènes pour d'autres scorpions que *B. occitanus occitanus*.

En ce qui concerne la *Rickettsiella* de *P. mirabilis* deux points sont à souligner, d'une part, cette rickettsie n'a été observée, parmi plusieurs centaines d'individus, que chez l'un d'entre eux, d'autre part, sa transmission par voie buccale n'est positive que pour moins de 10 % des individus. La rickettsiose est donc très rare et son maintien dans les populations de l'arachnide est problématique en raison de son faible pouvoir infectieux par des voies naturelles. Nous considérons que ce microorganisme est en réalité inféodé à un autre arthropode et que sa présence chez l'araignée est accidentelle, liée au comportement prédateur de cette dernière. Il s'agirait donc dans ce cas d'un germe potentiellement pathogène pour *Pisaura mirabilis*.

III - ETUDE DES RELATIONS ANTIGENIQUES DES *POROCHLAMYDIA* ET DE LA *RICKETTSIELLA* DE *PISAURA MIRABILIS*.

Les relations antigéniques des quatre microorganismes isolés chez les arachnides ont été étudiées par agglutination en tubes capillaires. Des comparaisons portent sur les relations au sein des genres *Porochlamydia* et *Rickettsiella* et entre ces deux genres. Au cours d'une étude précédente (Croizier et coll., 1975) *P. buthi buthi* avait été comparée à divers autres procaryotes.

Antigènes / Sérums	*Porochlamydia buthi buthi*	*Porochlamydia buthi pisauri*	*Porochlamydia piriformis*	*Rickettsiella sp.*
Anti *P. buthi buthi*	+++	+	+	0
Anti *P. buthi pisauri*	+	+++	+	0
Anti *P. piriformis*	+	+	+++	0
Anti *Rickettsiella sp.*	0	0	0	+++

TABLEAU III : AGGLUTINATIONS EN TUBES CAPILLAIRES DES CORPS ELEMENTAIRES DES 4 MICROORGANISMES ISOLES A L'AIDE DES SERUMS CORRESPONDANTS.

Antigènes / ıs	*Porochlamydia buthi buthi*	*Rickettsiella sp. pisaura mirabilis*	*Rickettsiella cetonidarum*	*Rickettsiella melolonthae*	*Rickettsiella tipulae*	*Rickettsiella grylli*
P. buthi buthi	++	0	0	0	0	0
Rickettsiella sp. ura mirabilis)	0	++	0	0	0	0
R. cetonidarum	0	-	++	0	+	0
R. melolonthae	0	0	+	++	+	0
R. tipulae	0	-	+	+	++	0
R. grylli	0	0	0	0	0	++

TABLEAU IV : AGGLUTINATIONS EN TUBES CAPILLAIRES DE *P. BUTHI* ET DE CINQ *RICKETTSIELLA* A L'AIDE DES SERUMS CORRESPONDANTS.

Comparaison des trois *Porochlamydia*.

Les résultats obtenus (Tableau III) montrent que les trois microorganismes : *P. buthi buthi*, *P. buthi pisauri* et *P. piriformis* sont sérologiquement apparentés ; une agglutination de leurs corps élémentaires est toujours observée quel que soit l'immunsérum utilisé. Ces agglutinations sont cependant toujours plus faibles avec les sérums non homologues qu'avec les sérums homologues, ce qui indique une structure antigénique particulière pour chacun des microorganismes.

Comparaison entre *Porochlamydia* et *Rickettsiella*.

Seule *P. buthi buthi* a été comparée avec plusieurs *Rickettsiella* (Croizier et coll., 1975) ; les autres *Porochlamydia* n'ont été comparées qu'avec la *Rickettsiella* de *P. mirabilis*.

Il n'existe pas de communauté antigénique entre les deux *Porochlamydia* et la *Rickettsiella* de *P. mirabilis* (Tableau III) ni entre *P. buthi buthi* et diverses *Rickettsiella* d'insectes (Tableau IV). La *Rickettsiella* de l'araignée ne montre également pas de communauté antigénique avec les autres *Rickettsiella* d'arthropodes (*R. grylli*, *R. tipulae*, *R. melolonthae* et *R. cetonidarum*).

Les trois *Porochlamydia* constituent donc un groupe sérologique différent des groupes déjà constitués pour les rickettsies d'insectes et de crustacés par Croizier et Meynadier (1971 a).

L'absence de communauté antigénique de la *Rickettsiella* de *P. mirabilis* avec les deux groupes sérologiques existant chez les *Rickettsiella*, laisse supposer l'existence d'un troisième groupe sérologique dans ce genre dont la *Rickettsiella* de l'araignée serait le premier représentant.

La comparaison de *P. buthi buthi* et des *Rickettsiella* avec les rickettsies pathogènes de vertébrés de l'ordre des Rickettsiales (*Coxiella burneti*, *Rickettsia prowazeki*, *Rickettsia typhi*, *Rickettsia conorii*, *Neo-rickettsia*) et une Chlamydiales (*Chlamydia psittaci*) a

par ailleurs montré l'absence de relation sérologique entre les microorganismes strictement inféodés aux arthropodes et ceux pathogènes des vertébrés (Croizier et coll., 1975).

IV - COMPARAISON DU CYCLE ET DES CARACTERES ULTRASTRUCTURAUX DANS LES GENRES *RICKETTSIELLA*, *POROCHLAMYDIA* ET *CHLAMYDIA*.

Si les transformations subies par les *Rickettsiella* et les *Porochlamydia* au cours de leur développement sont comparables à celles des *Chlamydia* et conduisent à l'apparition de formes successives ayant la même signification dans le cycle, ces genres de microorganismes diffèrent cependant beaucoup tant d'un point de vue morphologique qu'ultrastructural et doivent être, en fait, éloignés l'un de l'autre dans l'ordre des Chlamydiales. Ces différences que nous allons rappeler avant d'en discuter la valeur, sont très importantes et traduisent à notre avis le polyphylétisme de l'ordre des Chlamydiales du au critère primordial du cycle dans la diagnose de l'ordre.

1 - Cycle.

La seule variation notée dans le déroulement du cycle des divers microorganismes étudiés résulte de la dissociation ou non dans le temps de la multiplication quantitative et de la division des corps initiaux. Chez certaines *Porochlamydia*, comme chez les *Chlamydia*, la croissance des corps initiaux est immédiatement suivie de leur division ; ce n'est que dans de très rares cas que cette division conduit à la formation de plus de deux cellules filles. En revanche, chez les *Rickettsiella* comme chez *Porochlamydia piriformis*, il semble que les corps initiaux puissent croître sans obligatoirement se diviser.

Chez les *Rickettsiella*, des divisions synchrones, se produisent pour un même corps initial au moment de sa transformation en corps élémentaires ; ces divisions multiples entraînant la formation des "chaînettes" caractéristiques de ces microorganismes. Ce point avait déjà été signalé par Huger et Krieg (1967).

Chez *Porochlamydia piriformis*, les corps initiaux qui se multiplient lors de la croissance des microcolonies sont de grande taille ; ils devront subir trois séries de divisions successives avant de donner les corps intermédiaires qui vont conduire aux corps élémentaires.

2 - Morphologie et ultrastructure.

Nous ne considérons que les corps initiaux et les corps élémentaires, les caractéristiques des corps intermédiaires étant directement liées à celles de ces deux types de particules.

a) Les corps initiaux.

La forme des corps initiaux des *Porochlamydia* pose un problème en raison du polymorphisme important que montre ces particules chez l'araignée *Pisaura mirabilis*. Si chez le scorpion, *P. buthi buthi* possède toujours des corps initiaux sphériques, en revanche, chez l'araignée, *P. buthi pisauri* et *P. piriformis* exhibent un pléomorphisme important. Leurs corps initiaux sont soit bacilliformes, soit sphériques, ou ne présentent pas de formes définissables. Les particules bacilliformes ou sans forme déterminée sont rencontrées dans des vacuoles extrêmement riches en microorganismes et sont alors en contact les unes avec les autres. La comparaison de ces vacuoles avec celles rencontrées chez le scorpion, où les particules ne sont presque jamais en contact, permet de supposer que la forme des microorganismes tient plus aux contraintes qu'ils subissent du fait de l'encombrement spatial qu'à un caractère fixé. Cette hypothèse est renforcée par l'observation de formes sphériques chez l'araignée lorsque les particules disposent de plus d'espace comme cela se produit lorsque les vacuoles éclatent dans le cytoplasme ou lorsque ces particules se trouvent en position extracellulaire. Il est également possible que la forme soit en relation avec la fixation bien que la présence, sur une même coupe, de particules sphériques et de particules bacilliformes rende l'hypothèse d'un artefact dû à la fixation difficile à soutenir.

L'observation des vacuoles renfermant les particules au stade corps élémentaires montre bien le rôle que peut jouer le volume dispo-

nible dans ce pléomorphisme apparent. Chez le scorpion, les vacuoles sont restées relativement lâches et les corps élémentaires sont rarement alignés ; chez l'araignée au contraire, dans les vacuoles, les corps élémentaires tassés les uns contre les autres montrent souvent un arrangement très régulier. Il y a eu dans ce cas une diminution de taille des vacuoles de développement qui tendent à occuper le plus petit volume possible. Ces diverses observations nous conduisent à penser que la forme des corps initiaux des *Porochlamydia* est liée au développement intravacuolaire et dépend essentiellement des conditions d'encombrement spatial à l'intérieur des vacuoles. Ces conditions résultent elles-mêmes des valeurs de pression osmotique intra et extra-vacuolaire. La plasticité des limites des corps initiaux des *Porochlamydia* contraste donc avec l'absence d'un tel caractère chez celles des *Rickettsiella*. Ces dernières, quelle que soit leur position (intra ou extra-vacuolaire) présentent toujours un aspect bacilliforme. Il est donc vraisemblable qu'au niveau de la paroi de ces deux microorganismes existe une importante différence de structure. Il est possible d'après l'aspect des microcolonies des *Chlamydia*, que chez ces dernières comme chez les *Porochlamydia*, la forme sphérique résulte uniquement de la plasticité des limites cellulaires. Ceci est à mettre en rapport avec la très faible teneur ou l'absence de peptidoglycane chez les *Chlamydia* et les *Porochlamydia* , les peptidoglycanes étant responsables de la forme des bactéries gram-négatif (Dubray, 1975).

b) Les corps élémentaires.

Chez les *Rickettsiella*, l'organisation des corps élémentaires dérive directement de celle des corps initiaux par condensation du matériel nucléaire et du matériel cytoplasmique ; le nucléoide reste inclus dans le cytoplasme.

Chez les *Porochlamydia*, au contraire, on observe toujours un remaniement important qui conduit à une inversion totale ou partielle de la répartition de ces deux composants par rapport à leur situation dans les corps initiaux. A ce niveau également les *Porochlamydia* se rapprochent donc des *Chlamydia* chez lesquelles le nucléoïde acquiert une position latérale dans les corps élémentaires. Par rapport à ces derniers,

les corps élémentaires des *Porochlamydia* montrent une structure particulière de la paroi et une condensation plus importante du cytoplasme à laquelle il faut peut être relier l'arrangement paracristallin des ribosomes.

La comparaison de ces trois genres montre donc qu'il n'existe pas d'affinité entre les *Rickettsiella* d'une part, et les *Chlamydia* et les *Porochlamydia* d'autre part. Le point commun à tous ces microorganismes que constitue le cycle intracellulaire n'est à notre avis qu'un phénomène de convergence dû à l'adaptation des microorganismes à ce type de parasitisme. L'ordre des Chlamydiales si l'on y inclus le genre *Rickettsiella* va donc être un ordre hétérogène.

Les affinités entre *Chlamydia* et *Porochlamydia* sont plus importantes mais ne permettent pas de relier avec certitude les deux genres. Il est possible que les différences notées dans la structure de leurs corps élémentaires résultent d'adaptations particulières liées aux modes de contamination. En effet, on remarque chez les *Chlamydia* dont la transmission se fait généralement directement d'hôte à hôte (Schachter, 1978) que les formes de résistance sont beaucoup moins "condensées" que celles des *Porochlamydia* qui doivent, elles, supporter les conditions du milieu extérieur avant d'infecter un nouvel hôte. Les caractères ultrastructuraux des corps élémentaires des *Chlamydia* proches de ceux des corps intermédiaires des *Porochlamydia* traduisent à notre avis une adaptation moins poussée du germe en vue d'une survie hors de l'organisme que chez les *Porochlamydia*. Ces dernières paraissent donc plus évoluées bien qu'il soit possible que les *Chlamydia* aient subi une évolution régressive à ce niveau en raison de nouvelles possibilités de dispersion au sein des populations de vertébrés auxquelles ils sont actuellement liés.

V - DISCUSSION SUR LES DIVERS TYPES D'ANOMALIES RENCONTRES AU COURS DU DEVELOPPEMENT DES *RICKETTSIELLA* ET DES *POROCHLAMYDIA* (FORMES ANORMALES ET CORPS GEANTS).

Au cours des premières études de *Rickettsiella*, la présence de formations cristallines de grande taille (corps géants) associées aux microcolonies a été notée (Dutky et Gooden, 1952 ; Krieg, 1958). On leur attribue tout d'abord une origine cellulaire (Huger, 1959 ; Krieg, 1959) puis une origine rickettsienne (Huger, 1962) ; cette dernière ayant été confirmée par les observations de coupes au microscope électronique (Huger et Krieg, 1967). Les cristaux apparaissent au sein de formes de grande taille dont la nature rickettsienne ne fait pas de doute du fait de l'existence d'une paroi et d'une membrane cytoplasmique. Ces "corps géants" qui apparaissent en petit nombre dans les vacuoles de développement ont été observés chez la plupart des *Rickettsiella* décrites ultérieurement. Leur présence cependant n'est pas systématique et il est apparu que l'on pouvait différencier deux grands groupes de "corps géants" d'après la structure du matériel de nature protéique qu'ils renferment : structure cristalline ou structure fibrillaire.

Alors que Weiss (1974) rejette les corps géants en tant que critère pour la différenciation des *Rickettsiella*, certains auteurs pensent qu'il peuvent être considérés comme un caractère utilisable pour la systématique du groupe (Croizier, 1976 ; Louis et coll., 1977 b), et souhaitent l'introduction de ce critère dans la diagnose de l'ordre des Chlamydiales bien que l'apparition de tels corps n'ait pas pour l'instant fait l'objet d'études ni d'hypothèses particulières.

Les résultats apportés par l'étude des procaryotes se développant chez le scorpion *B. occitanus* et surtout chez l'araignée *P. mirabilis* vont nous permettre d'avancer certaines hypothèses quant à leur origine et de discuter la valeur à accorder à ces structures en tant que caractère utilisable en systématique.

Dans un cycle chlamydien typique (Page, 1974), les corps géants représentent des formes anormales des microorganismes. Chez les arachni-

des, les *Porochlamydia* et les *Rickettsiella* sont suceptibles d'évoluer vers de telles formes géantes ou non. Ce type d'évolution n'existe cependant pas chez certains des microorganismes décrits comme ceux se développant chez *B. occitanus* ou chez l'araignée *Coelotes luctuosus* (Osaki, 1973). Chez les *Rickettsiella* des araignées *Argyrodes gibbosus* et *P. mirabilis* quelques corps géants apparaissent dans les microcolonies. Pour les *Porochlamydia*, des corps géants se forment dans les microcolonies de *P. piriformis* et des formes aberrantes, mais d'une taille à peu près normale, apparaissent chez *P. buthi pisauri*.

Il y a donc formation de corps géants ou de formes anormales chez des microorganismes ne faisant pas partie du genre *Rickettsiella* et des différences au sein du genre *Porochlamydia* quant à la formation ou non de tels corps.

Un point important à notre avis qui n'a pas été relevé jusqu'à présent est le rapport existant entre le nombre des microorganismes qui évoluent normalement vers le stade corps élémentaires et le nombre de ceux qui vont donner les particules anormales. Les variations dans les microcolonies des procaryotes de *P. mirabilis* sont de deux types. Dans le cas de *P. buthi pisauri*, celles qui apparaissent concernent généralement l'ensemble des particules des microcolonies présentes dans certaines cellules. Si ces microcolonies représentent chacune un clône, il faut donc admettre que l'on se trouve en présence d'une variation phénotypique puisque tous les individus de la population sont concernés. Les variations phénotypiques chez les bactéries sont provoquées par les conditions imposées par le milieu : soit des conditions physico-chimiques, soit la présence d'agents inhibiteurs. Bien qu'il soit actuellement impossible de déterminer la cause exacte de ce développement anormal, le seul fait que ce microorganisme soit sujet à ce type de variation permet d'envisager l'emploi de substances inhibitrices : bactériostatiques ou bactéricides pour l'étude expérimentale de telles déviations.

Le deuxième type de variation se rencontre chez *P. piriformis* et chez la *Rickettsiella*. Dans la plupart des cellules de l'hépatopancréas, les microcolonies très importantes vont renfermer un très faible nombre de corps géants proportionnellement à celui des corps élémentaires.

On peut estimer par comptage sur coupe que ces corps géants représentent moins de $1/10^3$ particules. Cette estimation ne tenant pas compte de l'épaisseur des sections étudiées, il est probable, vue la très grande taille des corps géants, que ce nombre se rapproche de $1/10^4$. Cette très faible proportion est à comparer au taux de mutation spontanée chez les bactéries de l'ordre de 10^{-5} et il est alors possible de faire l'hypothèse que les corps géants sont des individus mutants ; la mutation considérée étant rendue visible du fait de son importance pour le métabolisme des microorganismes. Cette hypothèse paraît actuellement la seule qui donne à peu près satisfaction pour l'explication de l'origine de ces corps. Une variation phénotypique est en effet à exclure puisque la grande majorité des rickettsies continue à évoluer normalement.

Dans le cas de la *Rickettsiella*, les microcolonies dans certaines cellules digestives ainsi que celles se développant plus particulièrement dans les cellules du tissu interstitiel renferment une proportion de corps géants vraisemblablement comprise entre 1/20 et 1/100 particules. Le taux de la mutation conduisant aux formes géantes si l'on développe notre hypothèse est donc très fortement accru comme cela se produit chez les bactéries lorsqu'il y a action d'une substance mutagène. La cellule hôte aurait donc une action sur le microorganisme en renfermant une telle substance.

Dans l'hypothèse d'une telle origine des corps géants, l'expérimentation de substances connues comme mutagènes pour les bactéries pourraient permettre d'essayer de la vérifier. Un tel point allant dans le sens de cette hypothèse peut être avancé à la suite des travaux de Krieg (1958, 1959). Chez *R. melolonthae* cet auteur, en comparant les acides aminés des cristaux rickettsiens à ceux des substances albuminoïdes de l'hôte, a en effet montré l'absence dans la protéine cristalline de tyrosine. L'accumulation de certaines protéines dans les corps initiaux peut très bien résulter de l'absence de régulation d'une synthèse consécutive à une mutation soit au niveau des gènes régulateurs qui ne régulent plus la synthèse, soit au niveau des gènes de structure de la protéine déviée qui ne serait alors plus reconnue pour l'effet "feed back" de contrôle. La formation des cristaux de protéines sans tyrosine chez *R. melolonthae* peut être due à ce dernier type de mutation.

Il faut rappeler que nous avons observé le deuxième type de variations chez des microorganismes où semblent exister des "divisions" multiples. La possibilité pour ces microorganismes d'avoir une phase "polyploïde" durant une partie de leur cycle ne peut donc pas être a priori exclue ; certaines bactéries possèdent en effet plusieurs nucléoïdes au cours de leurs phase de croissance (Hayes, 1965). Plusieurs nucléoïdes sont d'ailleurs visibles dans les corps initiaux de la *Rickettsiella* et il est également possible que 8 exemplaires du chromosome soient déjà présents chez les corps initiaux de grande taille de *Porochlamydia piriformis* avant la série des 3 divisions conduisant aux corps intermédiaires. La répartition dans les cellules filles de ces génomes multiples pouvant alors donner lieu à des anomalies au cours de la migration des chromosomes.

Les hypothèses que nous venons d'exposer demandent naturellement a être vérifiées. On peut ajouter que les mutations détectées chez les procaryotes intracellulaires ne peuvent pas actuellement être du même type que celles détectées chez les autres procaryotes.

Ainsi pour les bactéries se sont surtout les mutants biochimiques qui sont isolés et étudiés ; les techniques de cultures sur milieu artificiel permettant de les révéler. Une bactérie mutante incapable de se multiplier passera inaperçue du fait de ces moyens d'étude et il n'est donc pas exclu que des mutations du même type que celle que nous supposons se produire chez les procaryotes intracellulaires existent également chez les bactéries.

Inversement, chez les procaryotes intracellulaires dont l'étude se base principalement sur des observations microscopiques, une mutation non suivie d'une altération morphologique suffisamment importante passera inaperçue. Nous devons rappeler que des corps cristallophores ou des corps géants ont été signalés en dehors des genres *Rickettisiella* et *Porochlamydia*, chez d'autres procaryotes intracellulaires comme les Chlamydia (Eb et coll., 1972, 1973 ; Popov et coll., 1977) les symbiotes (Louis, 1969) et les Rickettsia (Avakian et coll., 1973).

Il serait paradoxal d'utiliser des corps géants comme critère des *Rickettsiella* puisque d'une part ils ne sont pas spécifiques de ce genre et que d'autre part, si l'hypothèse selon laquelle ils sont des mutants est exacte, cela reviendrait à définir partiellement une espèce d'après ses mutants.

Cependant les études biochimiques et immunologiques de ces corps en association avec celles des formes normales des microorganismes pourraient apporter des éléments intéressants pour la systématique. En effet, d'après les premières études immunologiques (Croizier et Meynadier, 1971 a,b) plusieurs groupes sérologiques existent chez les *Rickettsiella* et les premiers résultats des essais de digestion enzymatique des protéines sur coupe (Louis et coll., 1977 a,b, ; sous presse) concordent avec ces données immunologiques.

VI - DISCUSSION SUR LE POUVOIR PATHOGENE DES MICROORGANISMES.

Les rickettsioses chez les arachnides sont des maladies de longue durée comparables en ce sens aux rickettsioses atteignant les insectes et les crustacés. En l'absence d'une action toxique des microorganismes, l'action pathogène résulte de l'importance physiologique des tissus qui sont préférentiellement attaqués, c'est-à-dire le tissu adipeux pour les insectes et les crustacés et l'hépatopancréas et le tissu interstitiel pour les arachnides. Chez ces divers hôtes, ces tissus ont un rôle comparable à celui joué chez les vertébrés par le foie ; ils interviennent dans le métabolisme intermédiaire tout en assurant un rôle de tissu de réserve pour les lipides et protides principalement.

L'action pathogène des microorganismes va donc résulter de l'importance de l'attaque de ces divers tissus et de l'impact sur le métabolisme général de l'hôte, de ce parasitisme. Chez les arachnides, des différences dans la pathogénicité des germes isolés chez un même hôte ou appartenant à un même genre vont nous permettre d'essayer d'expliquer le type d'action de ces microorganismes sur leurs hôtes.

1 - Maladies non létales des arachnides.

Les araignées infectées par les *Porochlamydia* à un stade jeune (stades 5 et 6) se comportent normalement, muent à des intervalles de temps comparables à ceux notés chez les témoins et atteignent le stade adulte sans présenter de retard dans leur développement. Bien que, chez de tels animaux, l'histopathologie révèle la présence en très grande quantité des germes dans la quasi totalité des cellules de l'hépatopancréas, le développement des *Porochlamydia* dans nos conditions d'élevage ne semble donc pas géner les araignées. Cependant, en raison de la grande quantité de nourriture dont ces dernières disposent on ne peut pas extrapoler les résultats de cette observation aux animaux naturellement infectés. Il est en effet vraisemblable que dans la nature et surtout durant les mois d'hiver, les araignées ne disposent pas d'autant de nourriture et soient alors plus sensibles aux infections.

L'effet cytopathogène est extrêmement faible. On ne note pas d'altération au niveau du cytoplasme et des organites cytoplasmiques dans les cellules hôtes et il ne semble pas y avoir de destruction importante de ces cellules. Pourtant l'apparition des corps élémentaires des germes dans les déjections suppose leur libération dans la lumière des diverticules digestifs. Les travaux de Millot (1926) sur l'histologie et la physiologie des Araneides apportent des éléments d'explication à nos diverses observations. Les cellules intestinales sont régulièrement remplacées chez les araignées tout au long de leur vie et régénérées par une décapitation de la partie apicale où se localisent les déchets. Les cellules responsables du remplacement sont de petites cellules situées le long de la basale des diverticules digestifs pour les cellules absorbantes et les cellules interstitielles pour les cellules à ferments. Ces cellules de remplacement, selon le microorganisme considéré, sont, soit très légèrement atteintes, soit exemptes de germes, peut être en raison de leur situation profonde et donc toujours suffisamment nombreuses pour assurer les remplacements cellulaires. Les germes trouvés dans les déjections proviennent soit des cellules éliminées soit de celles qui sont régénérées par la "décapitation". La situation

des microcolonies matures dans la région apicale laisse en effet supposer leur élimination par ce processus ; le regroupement de plusieurs microcolonies au sein d'une énorme vacuole apicale renforce cette hypothèse. Cette faiblesse d'action cytopathogène explique le peu d'impact de la maladie sur l'hôte. D'une part, les cellules se régénérent, d'autre part, la plupart des cellules renferment très vite des microorganismes sous leurs formes de résistance c'est-à-dire métaboliquement inactifs. S'il est logique de penser qu'au cours de leur croissance les germes dérivent à leur profit une partie des produits assimilés par la cellule et nuisent donc à l'organisme, à partir du moment où cette croissance se termine, la cellule non détruite va continuer à fonctionner normalement au seul bénéfice de l'animal et ce, malgré la présence des germes inactifs. Enfin, le tissu interstitiel non atteint ou faiblement atteint peut continuer à fonctionner normalement au cours de la phase de croissance microbienne et pallier grâce à ses réserves la baisse d'apport en éléments nutritifs.

Chez *Pisaura mirabilis* donc, la relative spécificité cellulaire des *Porochlamydia* et les processus de régénération des cellules digestives permettent d'expliquer l'absence d'action létale des germes.

2 - Maladies létales.

Contrairement aux rickettsioses à *Porochlamydia*, celle à *Rickettsiella sp.* est mortelle pour *Pisaura mirabilis*. Il semble que l'attaque simultanée des tissus interstitiel et digestif soit responsable de la pathogénicité de ce germe. Cette action pathogène plus importante se traduit avant la mort par une absence de mue tout au long de la maladie. Il est dans ce cas vraisemblable que l'attaque du tissu interstitiel rend impossible la compensation par l'utilisation de réserves des pertes subies par l'organisme au niveau du tube digestif. Pour la *Rickettsiella* donc, malgré l'absence d'un effet cytopathogène important, la maladie est létale en raison de son extension aux principaux tissus de l'araignée.

La mortalité consécutive à l'infection à *Porochlamydia* chez le scorpion va résulter d'un effet cytopathogène important des micro-organismes. Les cellules infectées sont en effet détruites à la fin du cycle et ne semblent pas être remplacées par de nouvelles cellules. L'absence de petites cellules basales chez le scorpion laisse supposer que la multiplication des cellules digestives et leur remplacement se fait directement par division de ces cellules digestives préexistantes. L'absence d'un tissu régénérateur hors d'atteinte des microorganismes et celle du phénomène de la décapitation observé chez les araignées entraînent donc la destruction totale du tissu digestif. En fin de maladie, l'épithélium des diverticules digestifs a disparu et l'animal cesse de s'alimenter. La survie de quelques semaines notée à la suite de cette destruction est alors due à l'utilisation des réserves du tissu interstitiel non attaqué par les microorganismes.

Ces différences d'action pathogène mettent en lumière l'importance des caractères physiologiques de l'hôte quant à leur sensibilité aux maladies. Chez les arachnides, en l'absence d'une destruction totale des cellules hôtes qui entraîne la disparition d'un organe vital, la pathogénicité des germes va donc être liée à l'extension ou non de la maladie à plusieurs tissus. Le partage entre deux tissus, du métabolisme intermédiaire et des substances de réserves, rend possible la survie des animaux infectés dans le cas d'un développement limité à un type cellulaire ; les arachnides paraissent donc favorisés par rapport aux insectes dont l'infection du seul tissu adipeux va entraîner la mort de l'hôte en raison de l'absence d'un autre tissu capable de suppléer, au moins durant la phase de croissance des germes, les pertes occasionnées par le parasitisme.

PLANCHE XXXIII

Etude comparée

de *Rickettsiella sp* et de *Porochlamydia buthi buthi*.

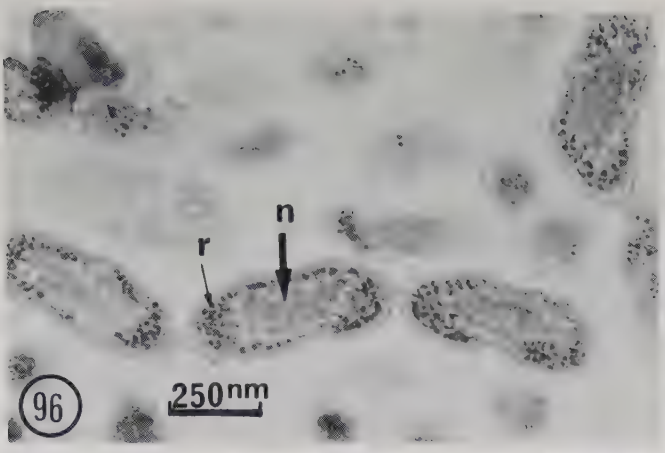
Fig. 96 et 97 : Caractérisation du nucléoïde (n) et des ribosomes (r) de *Rickettsiella sp* (Fig. 96) et de *Porochlamydia buthi* (Fig. 97) par "coloration régressive" à l'EDTA.
Fig. 96 : Corps intermédiaires en fin d'évolution. X 48000.
Fig. 97 : Corps élémentaires X 65000.

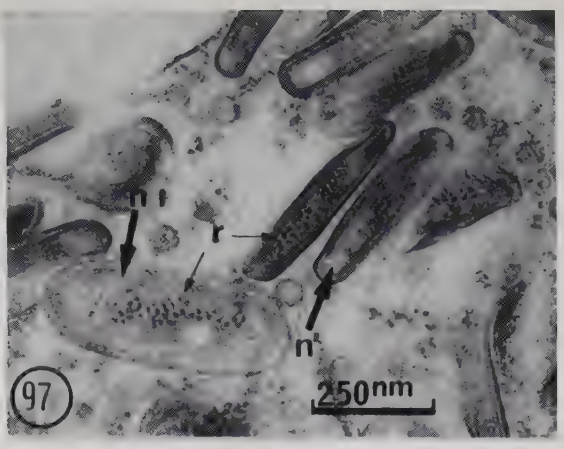
Fig. 98 et 99 : Après fixation au permanganate, on note un éclaircissement correspondant à la zone du nucléoïde (n) dans les corps élémentaires de *Rickettsiella sp* (Fig. 98) et de *Porochlamydia buthi* (Fig. 99). : point de jonction de la région centrale avec la membrane cytoplasmique. Fig. 98 : X 60000 ; Fig. 99 : 50000.

Fig. 100 et 101 : Cryodécapage de *Rickettsiella sp*. ci : corps initiaux en cours de division, ce : fractures transversales de corps élémentaires. PM1 face plasmique de la membrane interne, EM1 : face opposée. Fig. 100 : X 40000 ; Fig. 101 : X 55000.

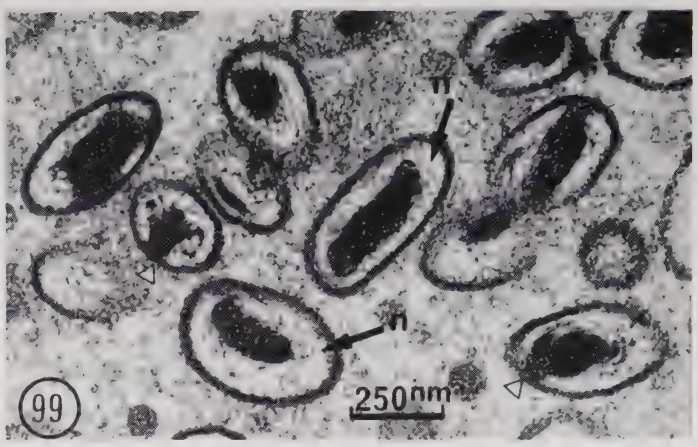
Fig. 102-103 et 104 : Cryodécapage de *Rickettsiella sp*. Clivages de la paroi. Les clivages concaves (OM2) sont granuleux et les clivages convexes (IM2) sont à peu près lisses. PM1 et EM1 face interne et face externe de la membrane plasmique. Fig. 102 : X 14000 ; Fig. 103 : X 100000 ; Fig. 104 : X 77000.

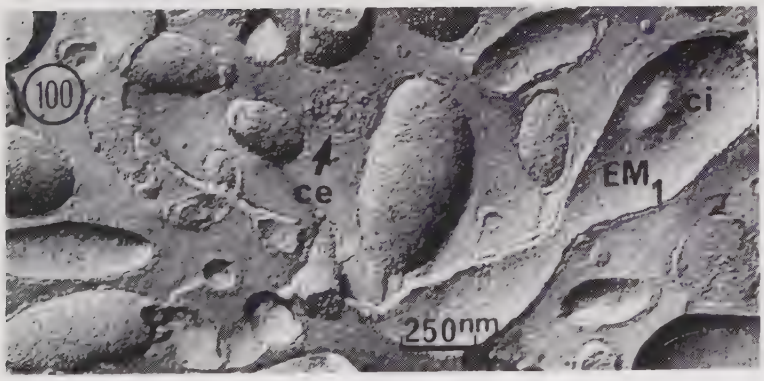
Remarque : Les clichés 98 à 104 ont été publiés dans "The Journal of Ultrastructure Research" (Louis et coll., sous presse).

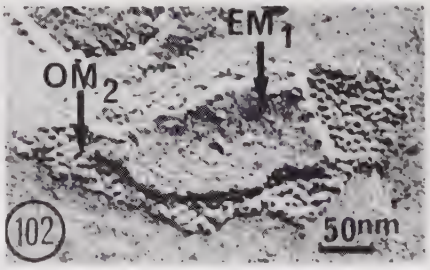

r
n
96
250nm

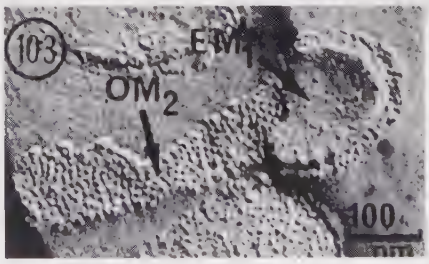

n
r
n
97
250nm

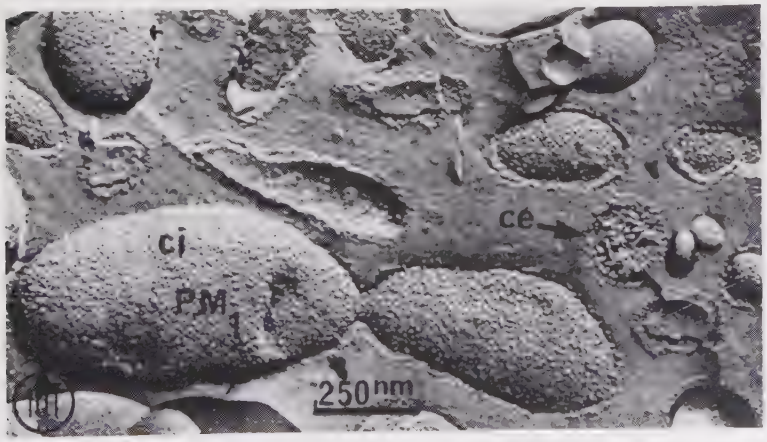
n
n
98
250 nm


n
n
n
99
250nm


100
ce
ci
EM1
250nm


EM1
OM2
102
50nm


103
EM1
OM2
100
nm


ce
ci
PM1
101
250nm

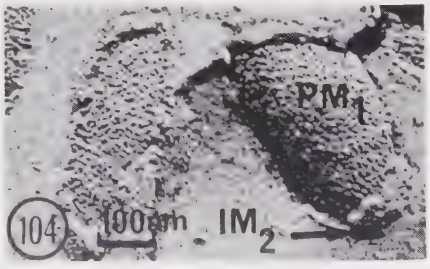

PM1
104
100nm
IM2

PLANCHE XXXIV

Etude comparée

de *Rickettsiella sp* et de *Porochlamydia buthi buthi*.

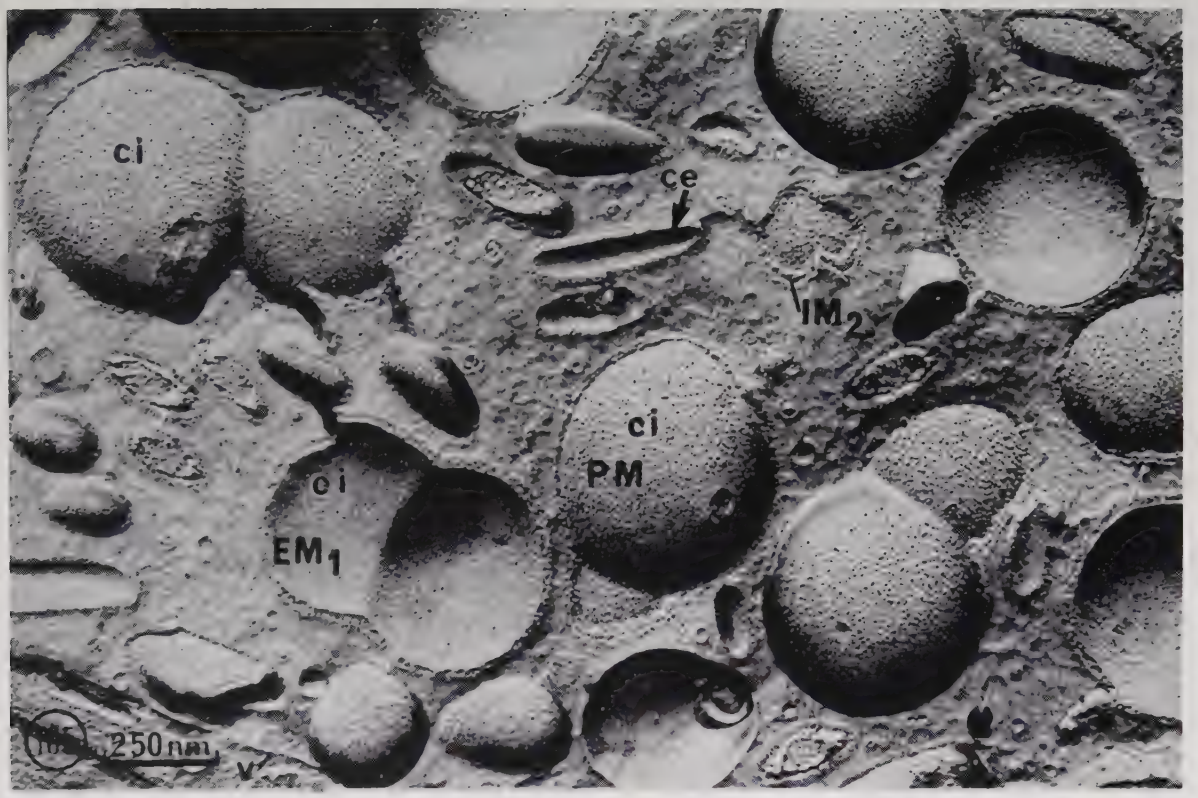
Fig. 105 à 107 : Cryodécapage de *Porochlamydia buthi*. Les corps initiaux (ci) sont sphériques et souvent en voie de division ; les corps élémentaires (ce) peuvent être clivés selon leur flanc large ce1, leur flanc étroit ce2 ou fractionné transversalement ce3.

Le clivage des corps initiaux s'effectue préférentiellement au niveau de la membrane plasmique : face interne PM1, face externe EM1.

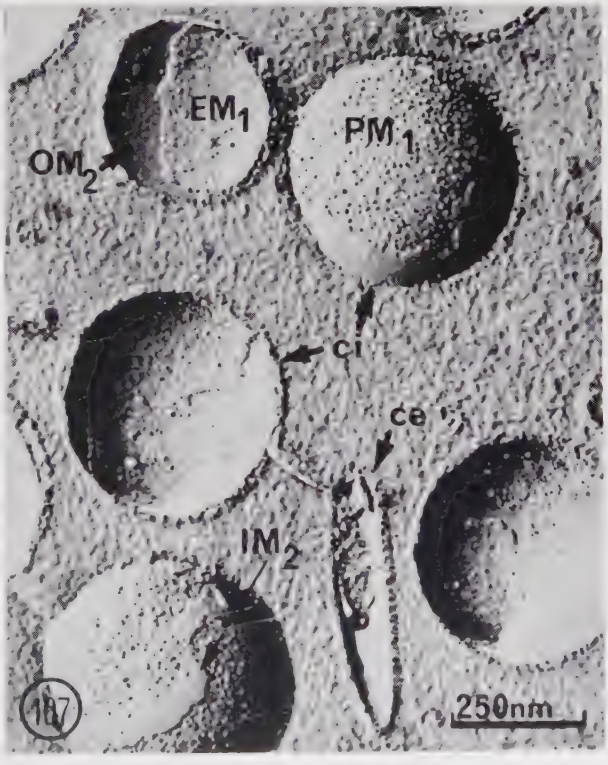
Les clivages de paroi, montrent une face externe OM2 et interne IM2 pratiquement lisses.

Fig. 105 : X 60000, Fig. 106 : X 55000, Fig. 107 : X 70000.

Remarque : Les clichés 105 à 106 ont été publiés dans "The Journal of Ultrastructure Research" (Louis et coll., sous presse).


ci
ce
IM2
ci
PM
ci
EM1
250nm

ce1
ce2
ce3
ce1
250nm


EM1
PM1
OM2
ci
ce
IM2
250nm

CHAPITRE VIII

ETUDE DE VIROSES CHEZ LE SCORPION *BUTHUS OCCITANUS* AM. ET CHEZ L'ARAIGNEE *PISAURA MIRABILIS* CL.

Outre des procaryotes, nous avons observé chez *P. mirabilis* et chez *B. occitanus* 5 virus dont 3 ont été étudiés (Morel, 1975 ; Morel et coll., 1977). Leur découverte résulte essentiellement de l'observation d'une certaine mortalité au sein des échantillons de scorpions et de l'examen systématique des déjections chez l'araignée. Pour cet animal, comme cela est le cas pour les rickettsioses, les viroses ne sont pas mortelles et ne peuvent être décelées par l'observation de symptômes pathologiques. Pour trois des viroses (une chez le scorpion et deux chez l'araignée), les particules virales ont été isolées et les maladies ont fait l'objet d'une étude expérimentale. Un certain nombre de difficultés que nous évoquerons plus loin se sont présentées au cours de l'étude des virus eux-mêmes et il a été impossible jusqu'à présent de les obtenir en quantité suffisante pour pouvoir en faire l'analyse biochimique ; seule une analyse partielle a pu être réalisée sur le virus cytoplasmique du scorpion qui s'est révélé être un virus à ARN. La position systématique de ces virus ne sera discutée que d'après leur architecture et leur mode de développement ; elle demande donc à être confirmée par des analyses ultérieures.

I - ETUDE D'UNE VIROSE CYTOPLASMIQUE DU SCORPION *BUTHUS OCCITANUS*

La mortalité parmi les scorpions capturés dans la région montpelliéraine peut atteindre 15 % au cours des deux premiers mois d'élevage. L'examen histologique des tissus prélevés sur les cadavres permet dans un peu plus de la moitié des cas d'attribuer la mort au développement de la rickettsie *P. buthi*. Pour les autres individus, on constate généralement une dégénérescence du tissu digestif sans pouvoir lier cette altération à un germe visible.

L'étude au microscope électronique de broyats bruts de ces animaux conduit dans quelques cas à l'observation de particules parasphériques de 60 à 70 nm de diamètre (Pl. XXXV, Fig. 108). L'ingestion de ces particules d'allure virale entraîne la mort des scorpions contaminés. Ces particules sont retrouvées dans leurs déjections et dans leurs cadavres ce qui confirme leur caractère infectieux et l'hypothèse de leur nature virale.

Cette virose atteint 3 à 5 % des scorpions capturés dans la région nord de Montpellier.

1) Pathogénie et histopathologie.

La maladie est reproduite expérimentalement par contamination de la nourriture à l'aide de suspensions virales concentrées par des centrifugations différentielles (Pl. XXXV, Fig. 108). L'évolution de la maladie n'entraîne pas l'apparition de symptômes particuliers. La survie peut atteindre 5 mois mais les premières mortalités sont notées à partir du 2ème mois. Une asthénie non spécifique précède de peu la mort des animaux. La présence du virus dans les déjections est détectée en microscopie électronique vers le 20ème jour d'infection et l'élimination des particules virales est ensuite continue jusqu'à la mort des scorpions. Les particules virales sont fréquemment associées à des structures en forme de bandelettes qui apparaissent constituées de sous-unités régulièrement disposées (Pl. XXXVI, n Fig. 114 à 116).

Les examens histologiques pratiqués tout au long de la maladie montrent que l'hépatopancréas est le seul tissu à présenter des altérations importantes. Cette observation associée à celle de particules dans les déjections permet de situer le lieu de multiplication du virus dans cet organe.

La première altération est notée dans les cellules digestives. Elle consiste en l'apparition dans certaines d'entre elles de petites granulations fortement eosinophiles qui contrastent par leur taille (1 à 5 µm) et leur affinité tinctoriale avec les grosses granulations rencontrées chez les animaux sains. Chez ceux-ci, les cellules sécrétri-

ces renferment des grains de sécrétion légèrement eosinophiles de 5 à 7 µm de diamètre et les cellules absorbantes des grains de 4 à 10 µm de diamètre se colorant du jaune-vert au rose violacé après coloration de Mann-Dominici. Les cellules absorbantes s'altèrent ensuite très rapidement (Pl. XXXV, Fig. 109) ; il apparaît au sein de leur cytoplasme des amas irréguliers constitués de petits grains fortement basophiles. Seuls ces amas sont ensuite visibles dans les cellules qui apparaissent en cours de lyse. Les cellules sécrétrices semblent susbsiter plus longtemps mais ont également disparu lors de la mort de l'animal. A ce moment l'intestin diverticulaire n'existe plus ; le tissu interstitiel non attaqué détermine seul les contours des anciens diverticules (Pl. XXXV, Fig. 100). Le déséquilibre du métabolisme des cellules digestives se traduit également souvent au cours de la maladie par l'accumulation dans les cellules elles-mêmes, puis dans la lumière des diverticules de cristaux de guanine.

Ces diverses altérations tissulaires ne permettent pas toutefois de déterminer la situation cellulaire de multiplication du virus. De plus elles ne sont pas spécifiques car nous les avons rencontrées également chez des individus où il a été impossible, pour l'instant, de détecter la présence de particules d'allure virale. Elles pourraient traduire des désordres métaboliques indépendants de la présence d'un agent infectieux.

2) Structure et morphogenèse du virus.

a) Structure.

Contrastés négativement, les virions sont isométriques et leur contour hexagonal présente des angles arrondis. Ils mesurent de 60 à 70 nm de diamètre (Pl. XXXV, Fig. 108). Les particules peuvent être réparties en deux groupes d'après leur taille ; le plus important par le nombre est composé de particules d'un diamètre moyen de 70 nm, l'autre de particules de 60 nm de diamètre. Dans le cas où il y a pénétration de l'APT, on peut mesurer l'épaisseur de la capside ; elle est d'environ 15 nm dans le premier groupe et de 11 nm dans le second.

L'existence de ces particules de deux tailles suggère que ce virus possède une double capside comme les Réoviridae ; les particules de petite taille correspondent au virus ne possédant pas encore la capside externe ou l'ayant perdue.

Des sous-unités de 11 à 12 nm de diamètre sont visibles à la surface des particules. Leur zone centrale dense permet de penser qu'elles ont une structure prismatique ou tubulaire (Pl. XXXVI, Fig. 111). Cette structure est confirmée par l'aspect crénelé présenté par la capside après pénétration de l'APT dans les virions.

Certaines particules présentent une ornementation supplémentaire sous la forme de projections fibrillaires d'environ 21 nm de long et terminée par une petite masse sphérique (Pl. XXXVI, Fig. 113). Ces projections semblent situées au sommet d'un icosaèdre à la manière des fibrilles portées par les pentons des *Adenovirus*. A côté des virions s'observent quelques particules de 40 à 45 nm de diamètre (Pl. XXXV, Fig. 108; Pl. XXXVI, Fig. 112) qui correspondent par la taille à une structure interne visible dans quelques cas après pénétration de l'APT.

On observe dans les broyats bruts, étroitement associés au virus, des structures en forme de bandelette. De 110 à 120 nm de large, elles peuvent atteindre plus d'un micromètre de long (Pl. XXXVI, Fig. 114 à 116). Elles renferment parfois des particules virales, ce qui indique qu'il s'agit en fait de structures tubulaires. Elles sont formées de sous-unités régulièrement disposées selon un arrangement ayant une symétrie d'ordre 3. Le diamètre de ces sous-unités (10 à 11 nm) se rapproche de celui des capsomères. Dans certains cas ces structures peuvent se désorganiser donnant alors des images de spirales ou de filaments (Pl. XXXVI, Fig. 114).

b) Morphogenèse.

Les virus sont observés sur coupes fines d'hépatopancréas dans des plages intracytoplasmiques (Pl. XXXVII, Fig. 118) ou dans la lumière des diverticules digestifs (Pl. XXXIX, Fig. 123).

Les viroplasmes, intracytoplasmiques, peuvent atteindre une grande taille (jusqu'à 10 µm). Ils ont des contours réguliers mais sont toujours nettement délimités. Leur opacité aux électrons est nettement plus forte que celle du cytoplasme environnant. On y distingue, formant

des amas plus ou moins importants, des particules de 55 à 60 nm de diamètre (Pl. XXXVII, Fig. 118 ; Pl. XXXIX, Fig. 122). Plusieurs stades de la morphogenèse virale peuvent être distingués.

A un stade précoce, les viroplasmes sont constitués d'un matériel homogène, légèrement dense aux électrons, où sont visibles de nombreuses structures hélicoïdales de 300 à 350 nm de long pour un diamètre de 25 nm correspondant à des polyribosomes (Pl. XXXVIII, Fig. 119).

Les viroplasmes évoluent ensuite vers des formations où apparaissent les premiers virus. Ces plages de densité aux électrons hétérogène , prennent un aspect réticulé. Un matériel moyennement dense aux électrons forme un réseau au sein duquel apparaissent les particules virales (Pl. XXXVIII, Fig. 120).

La formation des particules conduit progressivement au remplacement du réseau dense aux électrons par les virions (Pl. XXXVIII, Fig. 121).

Parfois visibles dans un même viroplasme (Pl. XXXVII, Fig. 118) ces trois étapes de la virogenèse sont généralement observées indépendamment les unes des autres dans les viroplasmes.

A la fin de la virogenèse, les particules sont regroupées et constituent des amas importants (Pl. XXXIX, Fig. 122). Il ne subsiste alors dans le reste de la plage que des zones homogènes, denses aux électrons, où les virus ne semblent plus être assemblés. Ces parties du viroplasme pourraient correspondre à l'accumulation de matériel non utilisé au cours de la virogenèse.

A la périphérie de certains viroplasmes âgés, on observe des structures tubulaires renfermant ou non des particules virales (Pl. XXXVI, Fig. 117). Ces tubules qui n'ont pas la structure de membrane unitaire présentant une surface extérieure en dents de scie due à la juxtaposition de petites sous-unités. Ils peuvent atteindre plus d'un µm de long pour un diamètre de 70 à 80 nm et correspondent aux tubules observés en contraste négatif. La largeur de ces derniers équivaut à la demie circonférence des tubules sur coupes fines (Pl. XXXVI, Fig. 114 à 116).

3) Purification et caractérisation partielle du virus.

Nous avons purifié le virus à partir de déjections de scorpions infectés ou de broyats totaux de scorpions. Dans les deux cas la purification s'est avérée difficile du fait de la présence dans le matériel d'un nombre considérable de cristaux de guanine, de tailles diverses, qui sédimentent avec le virus. Après concentration des virus par centrifugations différentielles et 2 à 3 cycles de centrifugation zonale en gradient de densité de saccharose, la purification est achevée par un ou deux gradients à l'équilibre en CsCl. Dans ces derniers, les virus se répartissent, de haut en bas, en 2 à 3 bandes de densité 1,32 à 1,36 dans lesquelles on trouve des capsides vides et des tubules, des particules intactes possédant leur double capside, des particules plus petites ayant perdu leur capside externe.

Nous avons pu obtenir une quantité suffisante de particules intactes pour faire l'analyse colorimétrique de l'acide nucléique. Celui-ci se révèle être de l'ARN et cette donnée biochimique a été confirmée par la cytochimie qui a révélé la réaction positive des plages virogènes à la coloration regressive à l'EDTA selon Bernhard (1968). Toutefois, faute de matériel nous n'avons pas pu caractériser davantage l'aide nucléique, en particulier sa caténarité.

4) Discussion.

Cubique, de 60 à 70 nm de diamètre, possédant une double capside et de l'acide ribonucléique, ce virus qui se développe dans le cytoplasme, est à rapprocher de certains représentants de la famille des Reoviridae. Non inclus, il s'éloigne comme certains autres virus d'invertébrés (Vago, 1966 ; Devauchelle et Vago, 1971 ; Bonami et coll., 1975 ; Hill, 1976 ; Mokhtar-Maamouri et coll., 1976 ; Johnson, 1978) des virus des polyédroses cytoplasmiques. On peut le rapprocher des Reoviridae libres connus chez les vertébrés : *Orbivirus*, *Reovirus* et surtout des *Rotavirus* (Fenner, 1976 ; Derbyshire et Woode, 1978) en raison de sa morphologie et de sa localisation intestinale.

II - ETUDE DE DEUX VIROSES CHEZ L'ARAIGNEE *PISAURA MIRABILIS*.

Au cours de la recherche de maladies infectieuses chez *P. mirabilis*, des particules d'allure virale ont été détectées dans les déjections de certains animaux sans qu'il soit possible de les associer à une mortalité particulière.

Le caractère infectieux et la nature virale de ces particules ont pu être établis par des infections expérimentales. Deux viroses ont été étudiées. Elles sont comparables quant à leur action sur l'hôte et quant à la localisation intranucléaire de la morphogenèse virale. Les virus sont morphologiquement très dissemblables ; l'un de 55 à 70 nm de diamètre est de symétrie cubique (Pl. XLV, Fig. 141), l'autre, ovoïde, mesure environ 180 nm de long sur 110 nm de large et est de symétrie hélicoïdale (Pl. XLI). Nous en parlerons en tant que virus icosaèdrique pour le premier et virus ovoïde pour le second.

En raison des ressemblances sur de nombreux points de ces deux viroses, nous les traiterons en parallèle. 2 à 3 % des araignées examinées sont porteuses du virus icosaèdrique et 5 à 7 % du virus ovoïde.

1) Pathogénie.

L'ingestion et l'inoculation des virus ovoïdes ou celles des virus icosaèdriques ne causent pas de troubles apparents chez les araignées. Le développement de ces dernières est normal dans la majorité des cas, de même que leur comportement. Contaminées à des stades jeunes (stades 5 et 6), les araignées, dans les conditions d'élevage, muent et grandissent au même rythme que les témoins. Elles atteignent le stade adulte et montrent aussi bien pour les mâles que pour les femelles un comportement normal de reproduction. Les pontes des araignées porteuses des virus ovoïdes et fécondées dans la nature donnent naissance à des jeunes normaux.

Les deux virus ne semblent donc pas avoir d'action pathogène importante sur l'hôte.

Les particules ingérées commencent à être disséminées par l'intermédiaires des déjections à partir de la troisième semaine d'infection.

2) Histopathologie.

Les coupes histologiques des animaux porteurs de virus montrent des altérations nucléaires dans les cellules de l'hépatopancréas (Pl. XL). Les cellules absorbantes comme les cellules à ferment sont le siège de ces modifications. Les autres tissus ne paraissent pas différents de ceux des animaux sains.

a) Virose due au virus ovoïde.

Les altérations nucléaires liées à la présence des virus ovoïdes concernent essentiellement les cellules des diverticules de l'hépatopancréas. Par rapport aux noyaux sains, les noyaux anormaux montrent un gonflement très important. Leur taille normalement comprise entre 5 et 7 µm pour les cellules absorbantes et entre 10 et 12 µm pour les cellules à ferment, atteint chez les animaux malades de 13 à 15 µm. Les noyaux ont une forme assez irrégulière mais sont généralement allongés (Pl. XL, Fig. 124, 126, 128). Deux stades peuvent être distingués dans les cellules atteintes. Le premier se caractérise par un léger gonflement du noyau et une réorganisation du matériel nucléaire. La chromatine forme une mince couche périphérique qui entoure un nucléoplasme légèrement coloré par les colorants nucléaires. Les granules de chromatine précédemment observés dans les noyaux sains ont alors disparu. Au cours du deuxième stade, l'ensemble du noyau est fortement coloré par les colorants nucléaires et une fine granulation apparaît à la périphérie (Pl. XL, Fig. 128). Une mince couche de chromatine subsiste et on observe de plus la présence de plages présentant les affinités tinctoriales des nucléoles. La coloration de Feulgen-Rossenbeck donne à ce stade, un résultat positif pour l'ensemble des noyaux à l'exception de ces plages.

Les cellules infectées ne semblent pas détruites ; on y observe la présence des granules de réserve ou de sécrétion comme dans les cellules saines et on ne peut pas y noter un accumulation particulière de substances de déchet. Il semble que ces noyaux hypertrophiés soient plus souvent situés dans la région apicale que dans la région basale des cellules hôtes.

Les noyaux hypertrophiés sont libérés dans la lumière des diverticules ; fréquemment observés dans la région céphalothoracique du

tube digestif, ils le sont plus rarement dans la région abdominale. La lumière du tube axial post-diverticulaire ne renferme pas de noyaux hypertrophiés mais un matériel amorphe feulgen positif qui correspond peut être au résultat de la lyse des noyaux libérés en amont dans la lumière des diverticules.

Il n'y a pas de destruction importante des cellules de l'hépatopancréas qui conserve un aspect fonctionnel.

b) Virose due au virus icosaédrique.

Les altérations nucléaires au cours de cette maladie concernent outre les cellules du diverticule digestif, quelques cellules de l'intestin post-diverticulaire. De même que dans la maladie précédente, on note une hypertrophie importante des noyaux qui peuvent atteindre 13 µm de diamètre. Toutefois, dans ce cas, les noyaux sont nettement sphériques ; on y distingue une zone centrale fortement teintée par les colorants nucléaires entourée d'une zone pellucide limitée par la membrane nucléaire contre laquelle subsiste quelques granules de chromatine (Pl. XL, Fig. 125, 127, 129). La zone centrale sphérique est fortement feulgen positif.

Il n'y a pas de lyse cellulaire, les noyaux sont rejetés dans la lumière des diverticules où ils apparaissent entourés d'une mince couche cytoplasmique. Ils doivent ensuite être très rapidement lysés car on ne peut les observer dans la lumière de l'intestin post-diverticulaire.

3) Structure et morphogenèse des virus.

a) Le virus ovoïde .

- Observations des suspensions virales en coloration négative.

Le virion se présente sous une forme ovoïde (Pl. XLI, Fig. 130). Il mesure de 160 à 180 nm de long sur 110 à 115 nm de large et un léger dépôt de phosphotungstate de sodium dans la région médiane lui donne l'aspect d'un grain de café. L'une des extrémités est arrondie, l'autre est légèrement disymétrique et paraît tronquée d'un côté (Pl. XLI, Fig. 130, 131).

La pénétration du colorant dans certaines particules (Pl. XLI, Fig. 130, 131) révèle leur structure interne. On constate alors que le virion se compose d'une enveloppe renfermant une structure cylindrique repliée en fer à cheval. Lors de la rupture de l'enveloppe, cette structure sort en se dépliant et prend l'aspect d'un bâtonnet de 340 à 360 nm de long sur 40 à 50 nm de large (Pl. XLI, Fig. 132, 133).

Cette structure correspond à une nucléocapside ; sa surface est finement ornementée (Pl. XL, Fig. 131, 132, 133) et paraît composée par la juxtaposition selon un arrangement hélicoïdal de petite sous-unités.

- Morphogenèse virale.

Sur les coupes ultra-fines, les virions sont principalement observés les noyaux (Pl. XLII, Fig. 134), mais il sont parfois intracytoplasmiques (Pl. XLIV, Fig. 140) ou libres dans la lumière des diverticules digestifs.

La morphogenèse virale se produit entièrement dans des noyaux de grande taille dont la chromatine est regroupée en amas le long de la membrane nucléaire. L'assemblage des nucléocapsides s'opère dans des régions renfermant un matériel granulo-fibrillaire dense aux électrons (Pl. XLIII, Fig. 135). Les granules ainsi que les fibrilles qui semblent résulter de leur fusion ont un diamètre de 10 à 15 nm. Les nucléocapsides nouvellement formées sont droites et claires aux électrons; elles se densifient progressivement. Elles sont toujours au moins de 300 nm de long et leur diamètre est de 30 nm environ.

L'enveloppement de la nucléocapside commence à l'une des extrémités de cette dernière (Pl. XLIII, Fig. 136), il gagne progressivement l'autre extrémité. Les sections transversales des virus à ce stade ne montrent qu'une seule section de la nucléocapside à l'intérieur de l'enveloppe (Pl. XLIII, Fig. 136 ; Pl. XLIV, Fig. 137).

Ultérieurement, les virions enveloppés possèdent la structure de ceux observés en contraste négatif (Pl. XLIV, Fig. 138, 139). Ils sont ovoïdes et leur nucléocapside est en forme de fer à cheval. Selon l'orientation des particules dans le plan de coupe, on observe donc soit la nucléocapside repliée (coupe sagittale) soit une nucléocapside en forme de bâtonner court (coupe longitudinale) soit deux sections circulaires de nucléocapside dans une seule enveloppe (coupe transversale)

(Pl. XLIV, Fig. 139). Le passage des nucléocapsides d'une forme droite à une forme courbe n'a pas pu être observé. Il suit l'enveloppement des particules et pourrait résulter d'une propriété particulière de l'enveloppe. Au cours de ce processus, la nucléocapside est repliée en deux branches de longueur égale ce qui suggère des propriétés particulières de la capside au niveau de la zone de repliement.

Dans certains noyaux hypertrophiés, on observe en association ou non avec les virions, la présence de formations membranaires qui représentent peut être des précurseurs d'enveloppes.

L'observation de particules virales intracytoplasmiques associées à des structures membranaires de type réticulum endoplasmique lisse (Pl. XLIV, Fig. 140) suggère la possibilité d'un phénomène de libération ("release") des virions sans, ou avant, que la cellule éclate.

b) *Le virus icosaèdrique.*

Contrastés négativement, les virions se présentent le plus souvent sous la forme d'hexagones réguliers (Pl. XLV, Fig. 141) ou légérement aplatis, plus rarement sous la forme de pentagones. Ces trois aspects traduisent une architecture de type icosaédrique. De taille moyenne, ils mesurent 70 nm de face à face. Le dépôt d'APT à leur surface est très régulier et ne met pas en évidence des structures qui pourraient rappeler des capsomères.

La virogenèse est intranucléaire (Pl. XLV, Fig. 142), mais ses divers stades n'ont pas été observés ou reconnus avec certitude. Les seules observations portent sur des noyaux où les virus sont déjà assemblés.

Ces noyaux sont de grande taille et restent limités par la membrane nucléaire apparemment intacte. On y distingue deux zones qui renferment toutes deux des virus de 45 à 50 nm de diamètre dont certains paraissent incomplets et constitués uniquement par la capside.

La zone centrale, grossièrement sphériques et dense aux électrons correspond à un énorme viroplasme occupant l'essentiel du volume nucléaire. Elle est constituée d'un matériel amorphe au sein duquel les virus sont regroupés en petits amas qui semblent être contigus et former une sorte de réseau. Les virus se présentent dans ces amas selon un arrangement paracristallin.

La zone périphérique correspond au nucléoplasme résiduel. Elle renferme le long de la membrane nucléaire quelques amas de chromatine et des virus libres. Très souvent, on y distingue également un nombre très important de virus régulièrement disposés dont l'ensemble forme une excroissance sur la masse d'inclusion centrale (Pl. XLV, Fig. 142, 143).

Dans les noyaux rejetés dans la lumière intestinale (Pl. XLV, Fig. 144), la membrane nucléaire disparaît et le matériel viroplasmique qui semble se condenser, devient très dense aux électrons. Les virus ne conservent pas leur arrangement paracristallin, ils sont libérés au niveau de plusieurs ouvertures situées à la surface de "la masse d'inclusion".

c) Discussion.

L'ensemble des données ultrastructurales présentées ci-dessus permet de rapprocher ces 2 virus de groupes de virus connus (Fenner, 1976) en considérant leur site de développement intranucléaire, leur taille et leur architecture. Toutefois, en l'absence de données biochimiques, la position systématique de ces virus ne peut être proposée qu'à titre provisoire.

Le virus ovoïde est enveloppé et possède une nucléocapside en forme de bâtonnet de symétrie hélicoïdale. Bien que son architecture soit assez originale, les principaux constituants du virion : enveloppe trilamellaire et nucléocapside cylindrique ainsi que son type de morphogenèse intranucléaire sont autant de caractéristiques propres aux représentants de la famille des Baculoviridae. Dans cette famille il se placerait dans le sous-groupe C qui regroupe provisoirement des *Baculovirus* non inclus.

Le repliement de la nucléocapside est l'une des caractéristiques les plus remarquables de ce virus, tant du point de vue architectural que morphogénétique. En effet la courbure de la nucléocapside est très rarement observée chez les *Baculovirus*. Elle est toujours moins importante, mais systématique dans le cas du virus libre de crustacé décrit par Pappalardo et Bonami (1979) et est accidentelle chez les *Baculovirus* des insectes (Smirnoff et Ackermann, 1977 ; Scharnhorst et coll., 1977) chez qui elle n'est observée que lors de la dissolution des corps d'inclusion.

Le virus icosaédrique qui mesure 70 nm de diamètre et dont la multiplication est intranucléaire se rapproche d'un virus décrit chez une hydre (Bonnefoy et coll., 1972) et d'un virus décrit chez une éponge (Vacelet et Gallissian, 1978). Comme ces auteurs l'on fait pour ces deux virus nous ne pouvons le rapprocher que de virus se développant chez des vertébrés et appartenant à la famille des Adenoviridae.

III - DISCUSSION.

Les viroses étudiées chez le scorpion et chez l'araignée montrent les mêmes caractéristiques quant à leur action sur l'hôte que les rickettsioses ; la virose du scorpion est mortelle, celles de l'araignée sont bénignes.

Le virus cytoplasmique du scorpion est responsable de la lyse des cellules hôtes qui, comme dans le cas des attaques rickettsiennes, ne sont pas régénérées. La destruction de l'épithélium digestif entraîne la mort des animaux.

Les deux virus de l'araignée ne semblent pas avoir d'action cytopathogène. La résistance cellulaire peut être expliquée si l'on se réferre aux observations de Millot (1926), selon lesquelles les cellules de l'hépatopancréas des araignées seraient binuclées.

Bien que nous ne puissions pas affirmer avec une certitude totale qu'il y ait présence dans les cellules de deux noyaux comme le dit cet auteur, l'expulsion hors des cellules des noyaux infectés seuls ou entourés d'un cytoplasme très réduit, indique que la plus grande partie des cellules hôtes reste dans l'épithélium des diverticules digestifs, survit à l'infection et possède donc vraisemblablement encore un noyau fonctionnel. L'absence d'observation de deux noyaux infectés dans la même cellule montre que si elles sont réellement binuclées, seul l'un des noyaux est susceptible de permettre le développement des virus. Il apparaît donc important de confirmer les observations de Millot puisque leur véracité entraînerait que selon l'état fonctionnel des noyaux, ceux-ci sont ou non capables d'assurer une virogenèse.

A l'uniformité relative des aspects histopathologiques et pathogéniques de ces viroses s'oppose une grande diversité quant aux caractéristiques mêmes de leurs agents. Nos résultats, bien que fractionnaires, nous ont permis de décrire un virus apparenté au groupe des Reoviridae chez le scorpion *B. occitanus* et deux virus très différents chez l'araignée *P. mirabilis*, dont l'un est selon toute vraisemblance un *Baculovirus*. Des observations ultastructurales non rapportées dans ce travail car trop fragmentaires, nous ont également permis d'observer d'autres particules d'allure virale sur coupes ultrafines d'hépatopancréas de ces 2 arthropodes. Ainsi nous avons décelé dans le noyau de cellules digestives de *B. occitanus* des particules isométriques de 45 à 50 nm de diamètre. De même certains noyaux de l'hépatopancréas de *P. mirabilis* renferment des petites particules de 30-35 nm de diamètre que l'on retrouve parfois en coloration négative dans les déjections. Ces 2 types de particules sont généralement associées à celles décrites dans ce chapitre. Ces observations, jointes à celles rapportées dans ce chapitre montrent la grande diversité du monde viral chez les arachnides, diversité insoupçonnée jusqu'à ce jour.

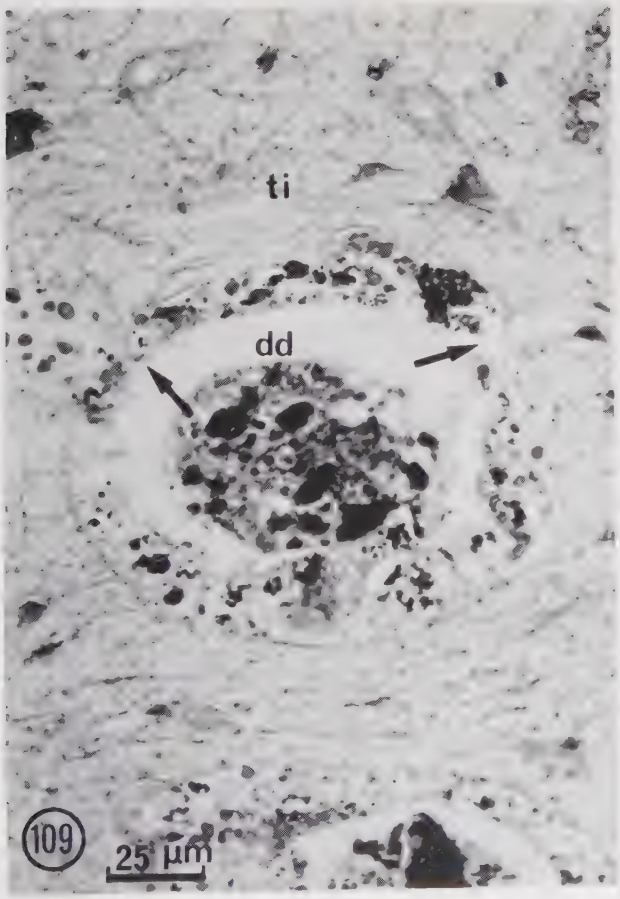
PLANCHE XXXV

Virose de *Buthus occitanus*.

Fig. 108. : Virus partiellement purifiés. Des particules de 70 nm voisinent avec des particules plus petites (60nm). Quelques rares structures de 40 nm de diamètre sont également visibles (►). X 73000.

Fig. 109 et 110. : Coupes histologiques d'hépatopancréas. Le tissu interstitiel (ti) n'est pas lésé. Dans les diverticules digestifs (dd) la taille des cellules est réduite et l'épithélium commence à disparaître (➡, Fig. 109) ou à presque totalement disparu (➡, Fig. 110). Il y a une accumulation importante de débris cellulaires dans la lumière des diverticules digestifs. Coloration de Mann-Dominici. X 250.

108
100nm


ti
dd
109
25 µm

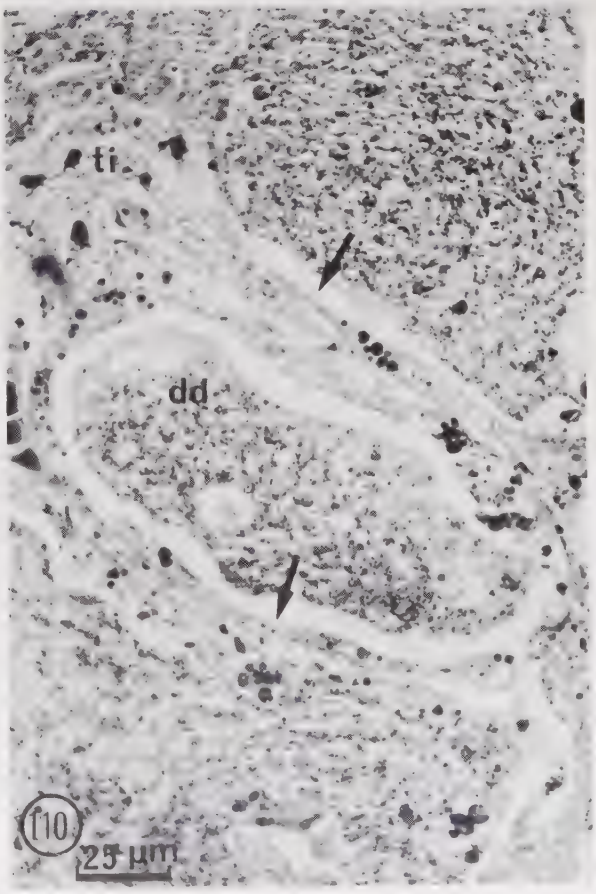

ti
dd
110
25 µm

PLANCHE XXXVI

Virose de *Buthus occitanus*.

Structure du virus en coloration négative.

Fig. 111. : La double capside est visible dans les virus pénétrés par l'APT. A la surface des particules intactes, les capsomères apparaissent comme des structures creuses, prismatiques ou cylindriques (➞). X. 120000.

Fig. 112. : De petites particules (▶) sont visibles, soit libres dans les préparations, soit à l'intérieur de virions pénétrés par l'APT. X 145000.

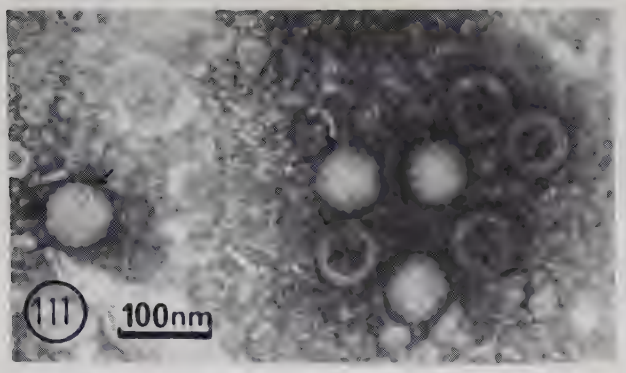
Fig. 113 (a et b) : Particules montrant des projections (➞) géométriquement disposées. X 140000.

Structures tubulaires associées au virus.

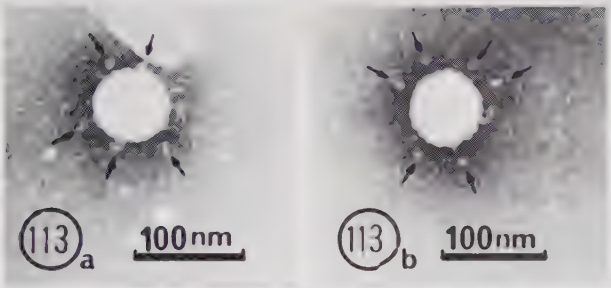
Fig. 114. : La nature tubulaire des structures apparaît à la suite de leur dégradation partielle (⟶). X 97000.

Fig. 115 et 116. : Une ou plusieurs particules virales (➞) peuvent être enfermées dans les tubes. Ces derniers sont constitués de sous-unités nettement visibles. Fig. 115 : X 65000 ; Fig. 116 : X 72000.

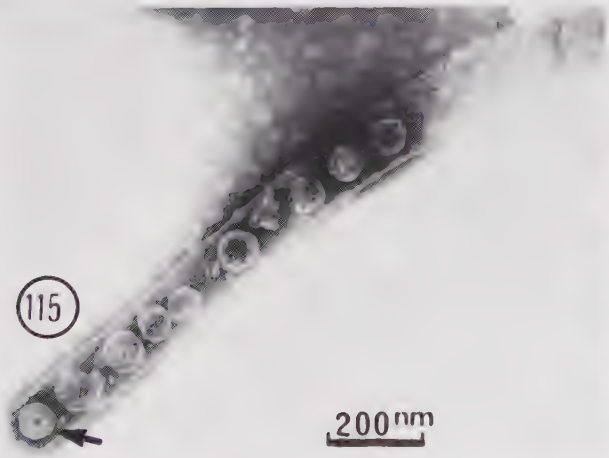
Fig. 117. : Coupe fine d'hépatopancréas. Détail de la zone périphérique d'un viroplasme. A côté de virus libres, quelques particules (➞) sont enfermées dans des structures tubulaires vues ici en coupe longitudinale . X 88000.

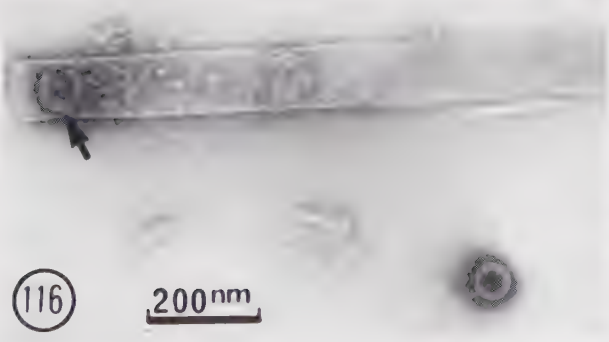

111
100nm

112
100nm


113a
100nm
113b
100nm

114
100nm


115
200nm


116
200nm

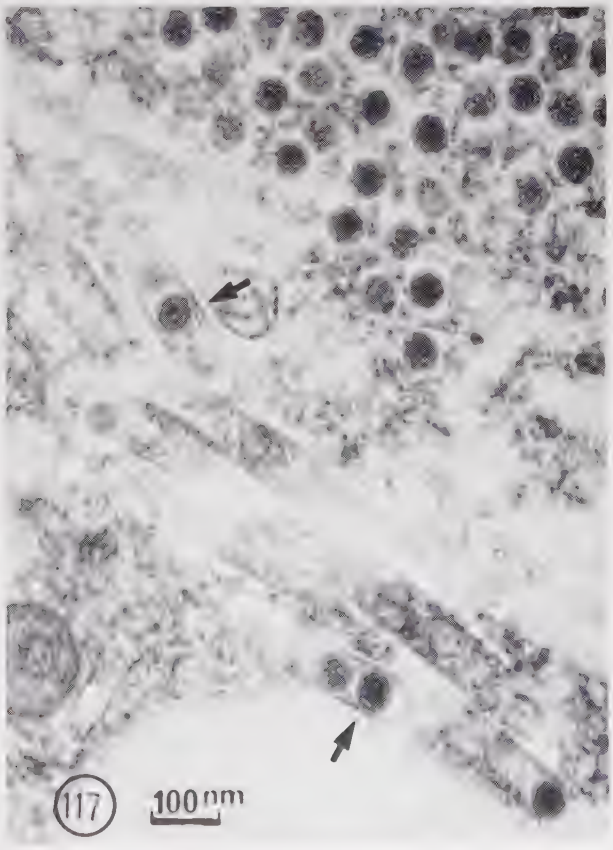

117
100nm

PLANCHE XXXVII

Virose de *Buthus occitanus*.

Fig. 118. : Viroplasme dans une cellule d'hépatopancréas.
Trois types d'organisation du viroplasme correspondant à trois phases de la virogenèse peuvent être distingués :

▲ région finement granulaire renfermant des polyribosomes (□),
R région montrant une condensation du matériel viroplasmique,
V zone d'apparition des virions.

X 26000.

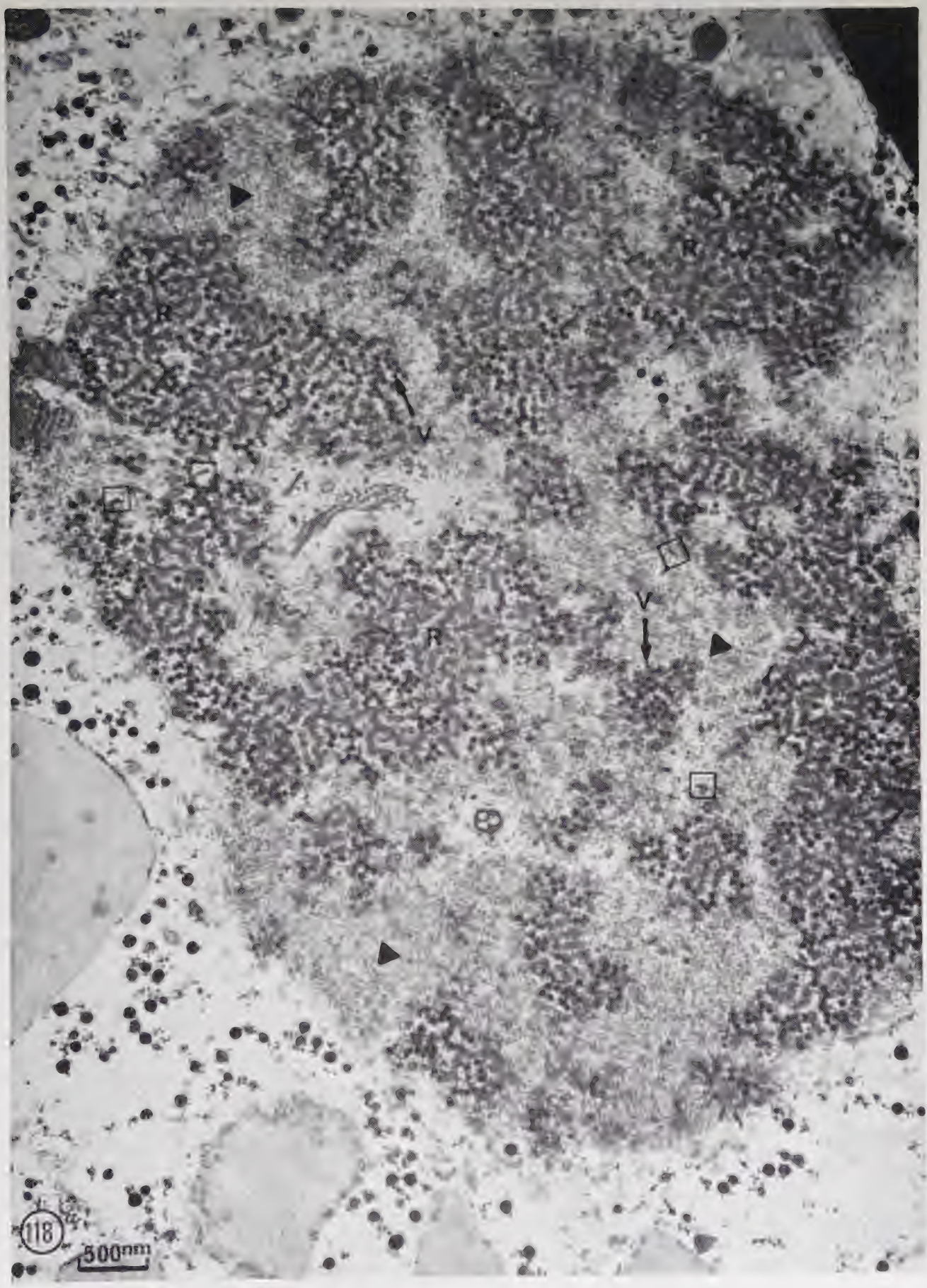

R
V
R
V
R
R
118
500nm

PLANCHE XXXVIII

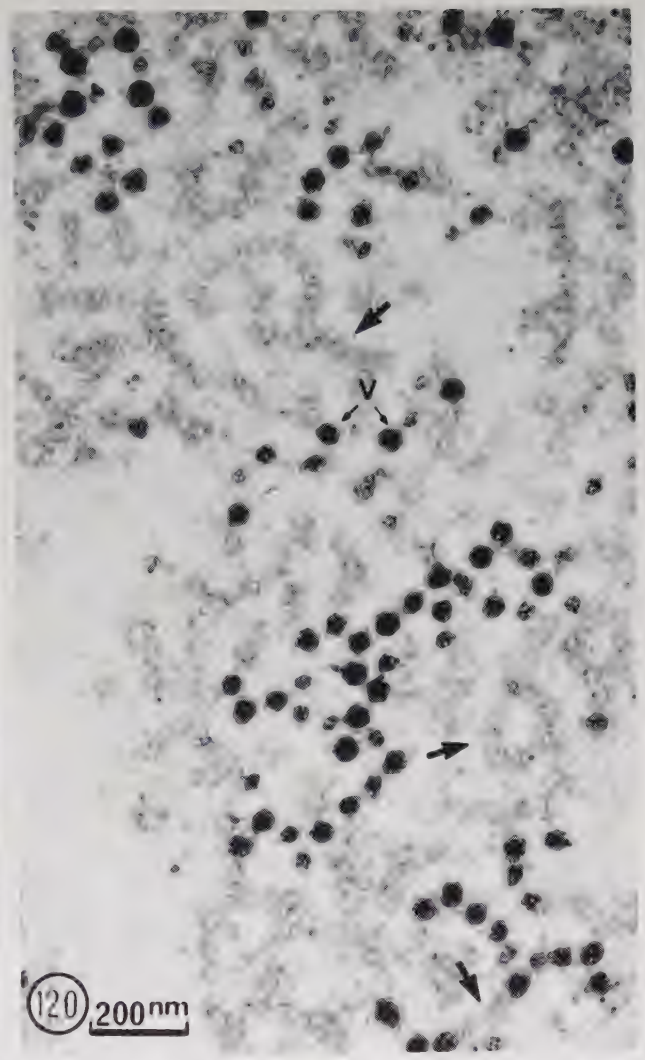
Virose de *Buthus occitanus*.
Evolution du viroplasme.

Fig. 119. : Détail d'un viroplasme à un stade précoce. De nombreux polyribosomes (➔) sont visibles au sein d'un matériel finement granulaire. X 475000.

Fig. 120. : Condensation du matériel viroplasmique qui constitue un réseau (➔) au sein duquel les virus (v) s'assemblent. X 62000.

Fig. 121. : Aspect d'un viroplasme en fin de virogenèse. Les virus sont encore alignés (➔) à l'emplacement du réseau où ils se sont assemblés. X 55000.

119
200nm


V
120
200nm

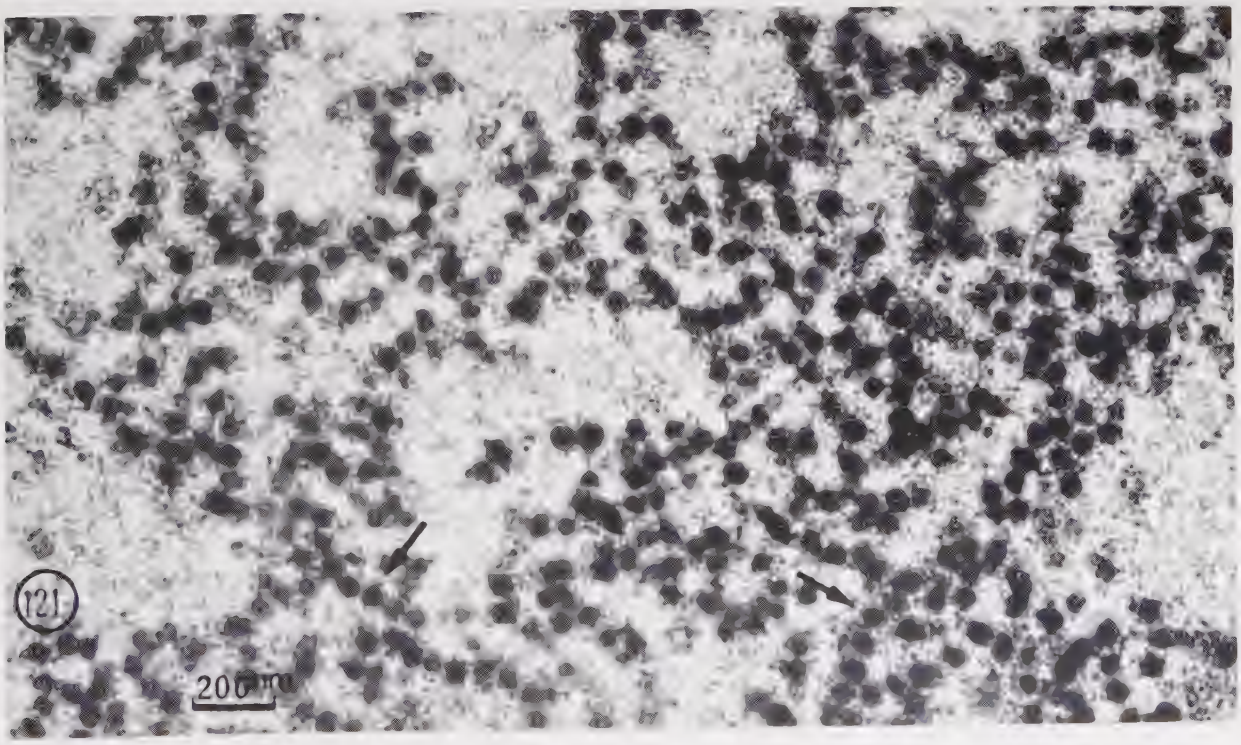
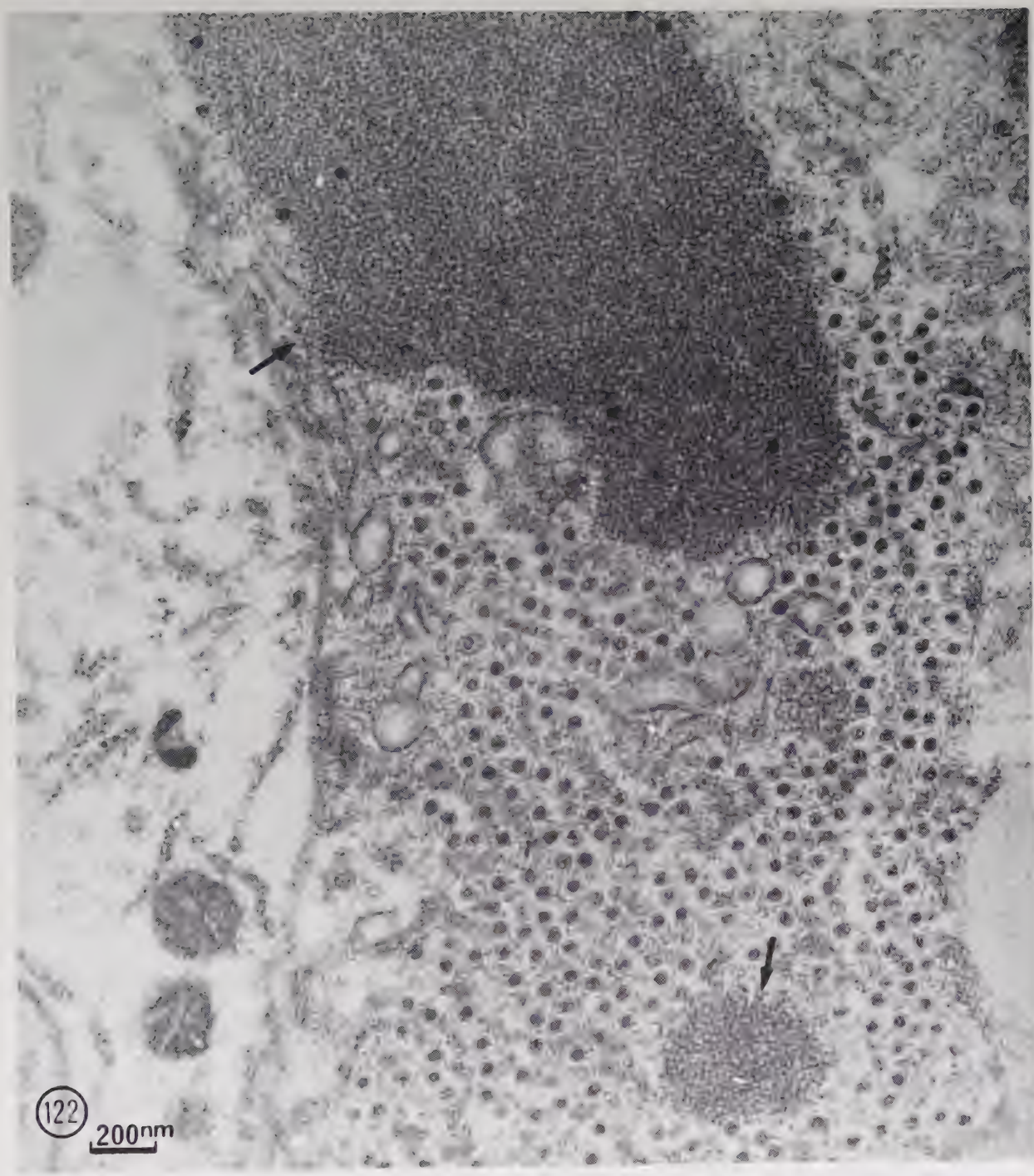

121
200nm

PLANCHE XXXIX

Virose de *Buthus occitanus*.

Fig. 122. : Viroplasme en fin d'évolution. Les virus sont regroupés ; il ne subsiste du stroma initial que quelques amas denses où il ne semble plus se produire de morphogenèse virale (➡). X 50000.

Fig. 123. : Virus en position extracellulaire. Les virus (v) sont visibles dans la lumière du diverticule digestif entre deux cellules voisines (c1 et c2). mv : microvillosités. X 50000.


122
200nm

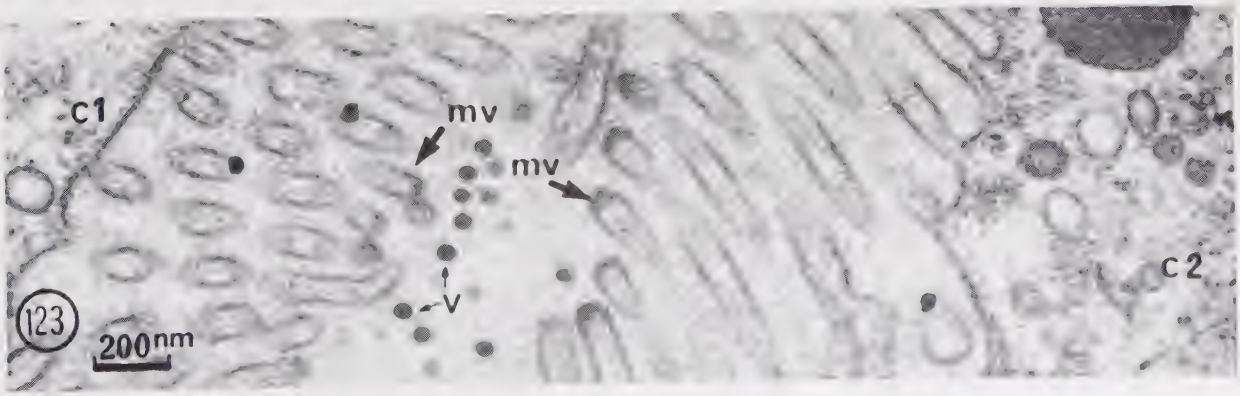

c1
mv
mv
v
c2
123
200nm

PLANCHE XL

Viroses de *Pisaura mirabilis*.
Histopathologie.

Virose à *Baculovirus*.

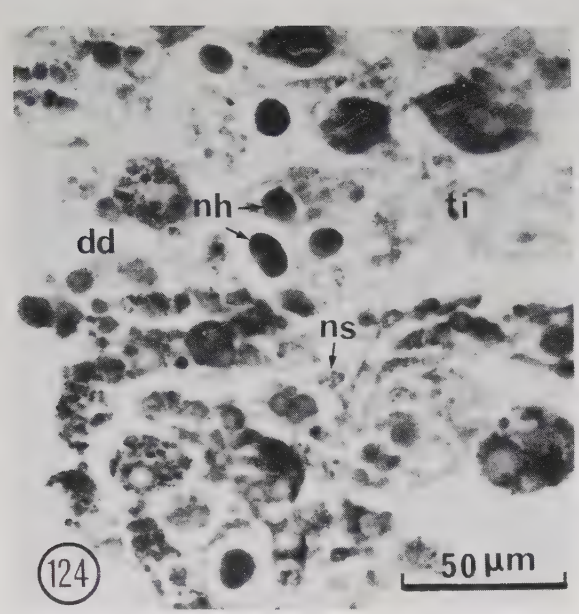
Fig. 124-126. : Coupe histologique de l'hépatopancréas. Dans les cellules des diverticules digestifs (dd)), de nombreux noyaux sont hypertrophiés (nh). ti : tissu interstitiel, ns : noyau sain. Coloration de Mann-Dominici. Fig. 124 : 440 ; Fig. 126 : X 880.

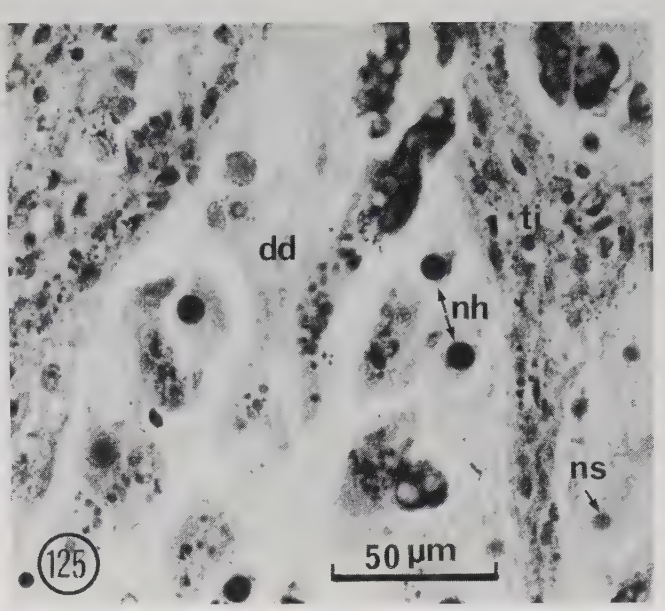
Fig. 128. : Coupe semi-fine de l'hépatopancréas. Dans le noyau sain (ns), la chromatine est regroupée en amas dispersés dans l'ensemble du nucléoplasme. Dans le noyau hypertrophié (nh), le nucléoplasme est légèrement coloré et la chromatine principalement regroupée le long de la membrane nucléaire. Coloration : bleu de toluidine boraté. X 880.

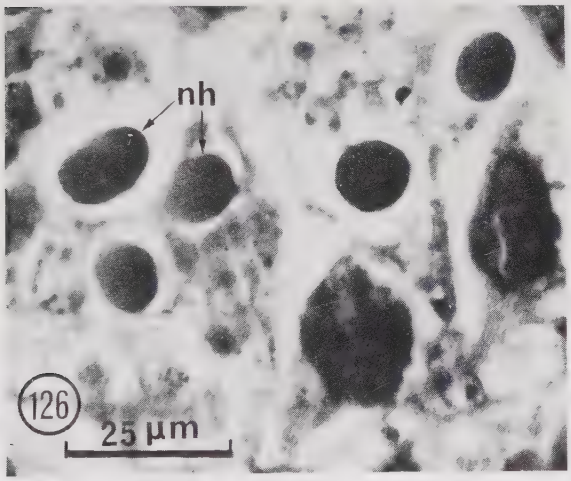
Virose à virus icosaèdrique.

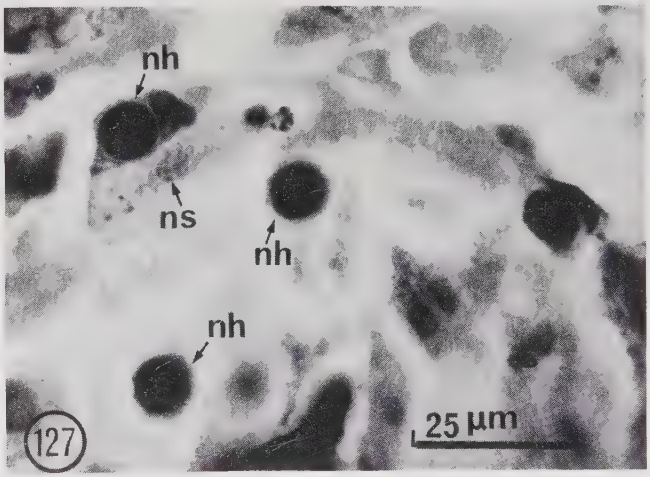
Fig. 125-127. : Coupe histologique d'hépatopancréas. De nombreux noyaux dans les diverticules digestifs (dd) sont hypertrophiés (nh) ti : tissu interstitiel, ns : noyau sain. Coloration de Mann-Dominici. Fig. 125 : X 440 ; Fig. 127 : X 880.

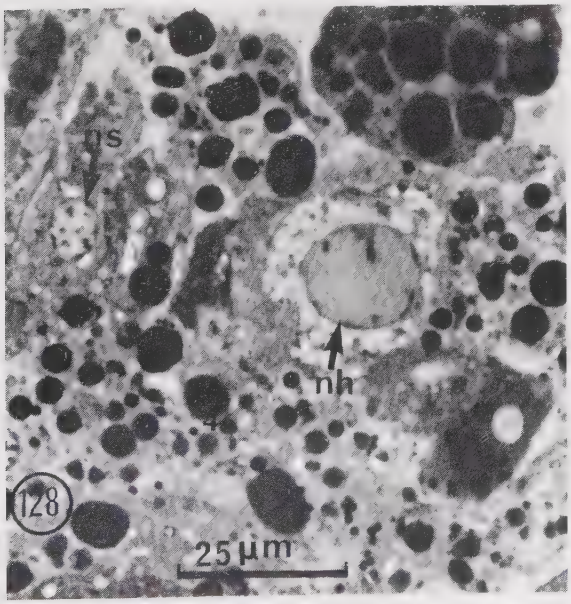
Fig. 129. : Coupe semi-fine d'hépatopancréas. Dans le noyau hypertrophié (nh), on distingue une zone centrale fortement colorée entourée d'une zone pellucide et la chromatine (chr.) le long de la membrane nucléaire. ns : noyau sain. Coloration : bleu de toluidine boraté. X 1150.


nh
ti
dd
ns
124
50 µm


dd
ti
nh
ns
125
50 µm


nh
126
25 µm


nh
ns
nh
nh
127
25 µm


ns
nh
128
25 µm

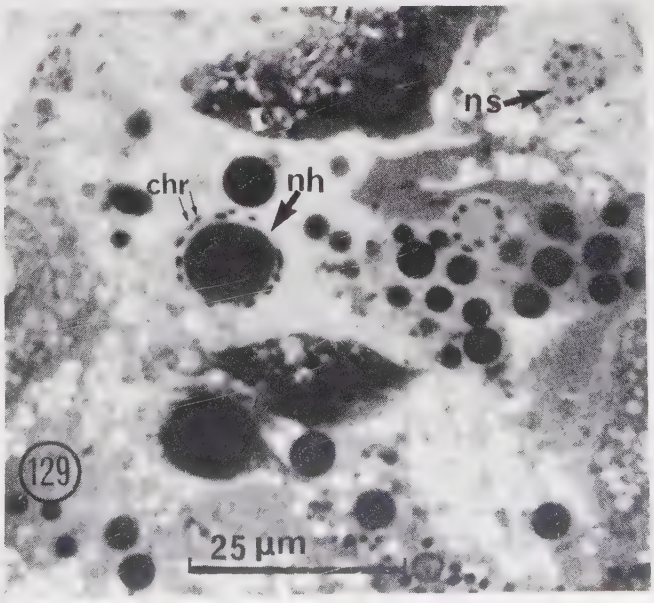

ns
chr
nh
129
25 µm

PLANCHE XLI

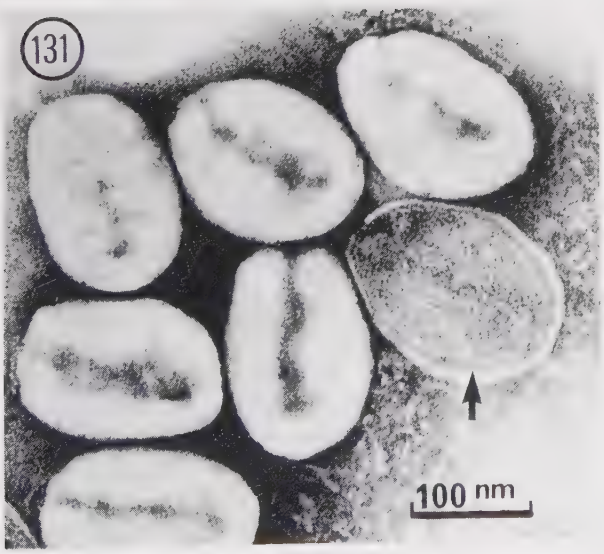
Virose à *Baculovirus* de *Pisaura mirabilis*.
Structure des virions.

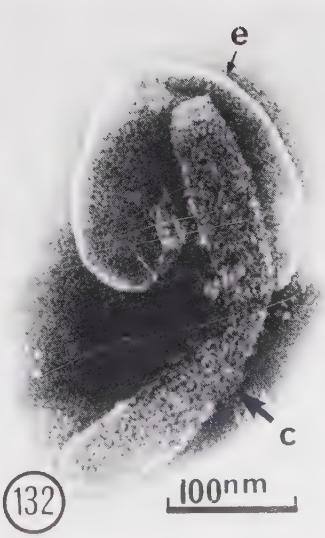
Fig. 130-131. : Suspension partiellement purifiée de particules virales. Les particules intactes ont une forme caractéristique de grain de café. Les particules pénétrées par l'APT révèlent l'existence d'une enveloppe (e) et d'une nucléocapside en forme de fer à cheval (c). La structure hélicoïdale de la nùcléocapside est parfois visible (➡). Fig. 130 : X 140000, Fig. 131 : X 160000.

Fig. 132. : La nucléocapside (c) se déplie lors de l'ouverture de l'enveloppe (e). X 170000.

Fig. 133. : Nucléocapside entièrement dépliée obtenue après traitement des virions par le détergent NP40. Des sous-unités disposéesselon un arrangement hélicoïdal sont visibles à sa surface. X 160000.

e
c
c
130
100 nm


131
100 nm


e
c
132
100nm

133
100 nm

PLANCHE XLII

Virose à *Baculovirus* de *Pisaura mirabilis*.

Fig. 134. : Section d'une cellule absorbante de l'hépatopancréas. Le noyau infecté (N) est séparé du cytoplasme par sa membrane (mn) apparemment intacte. Il renferme de nombreux virions dont la nucléocapside est repliée en fer à cheval.
Le cytoplasme (CY) ne contient pas de virus . X 21000.

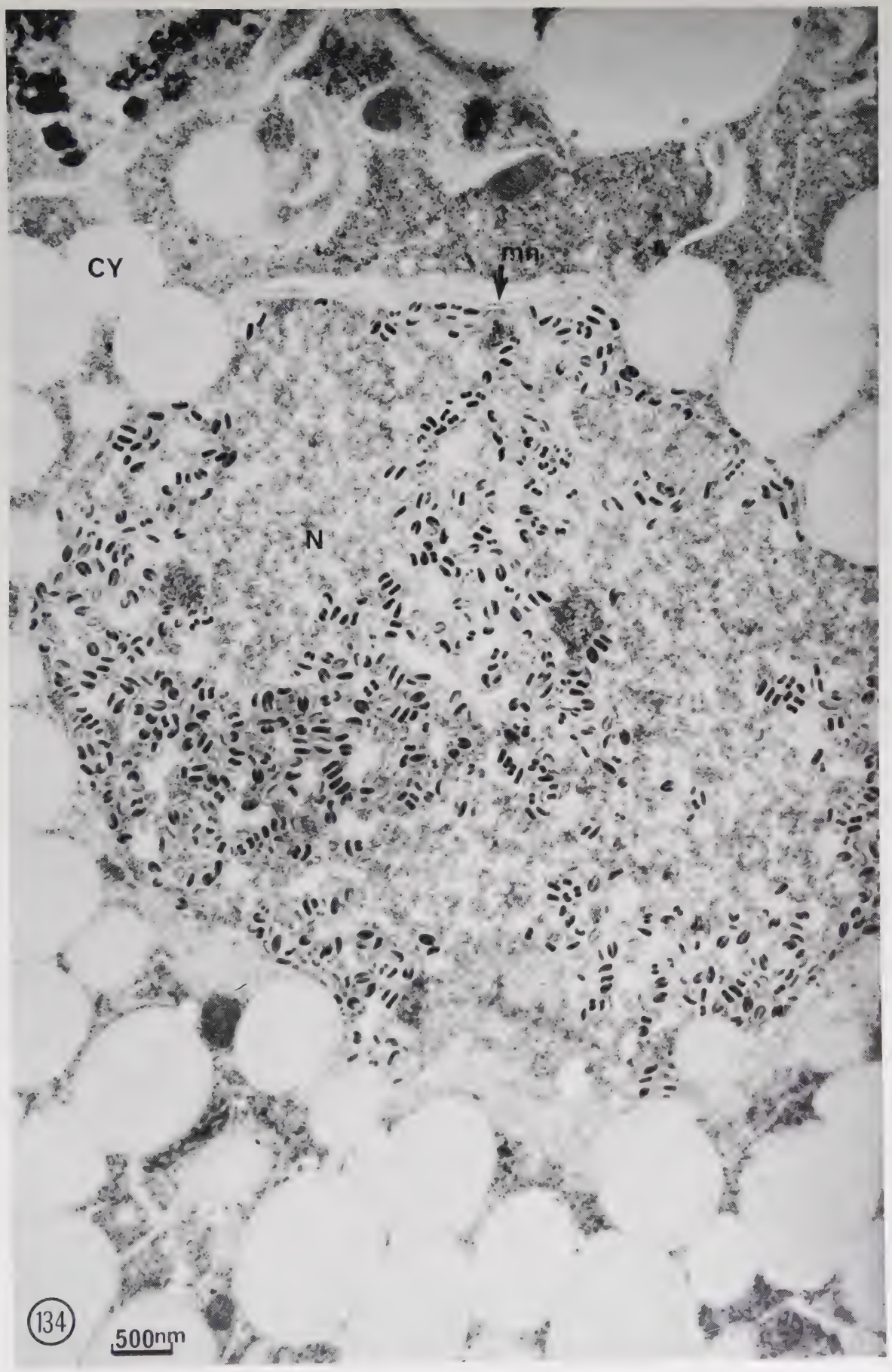
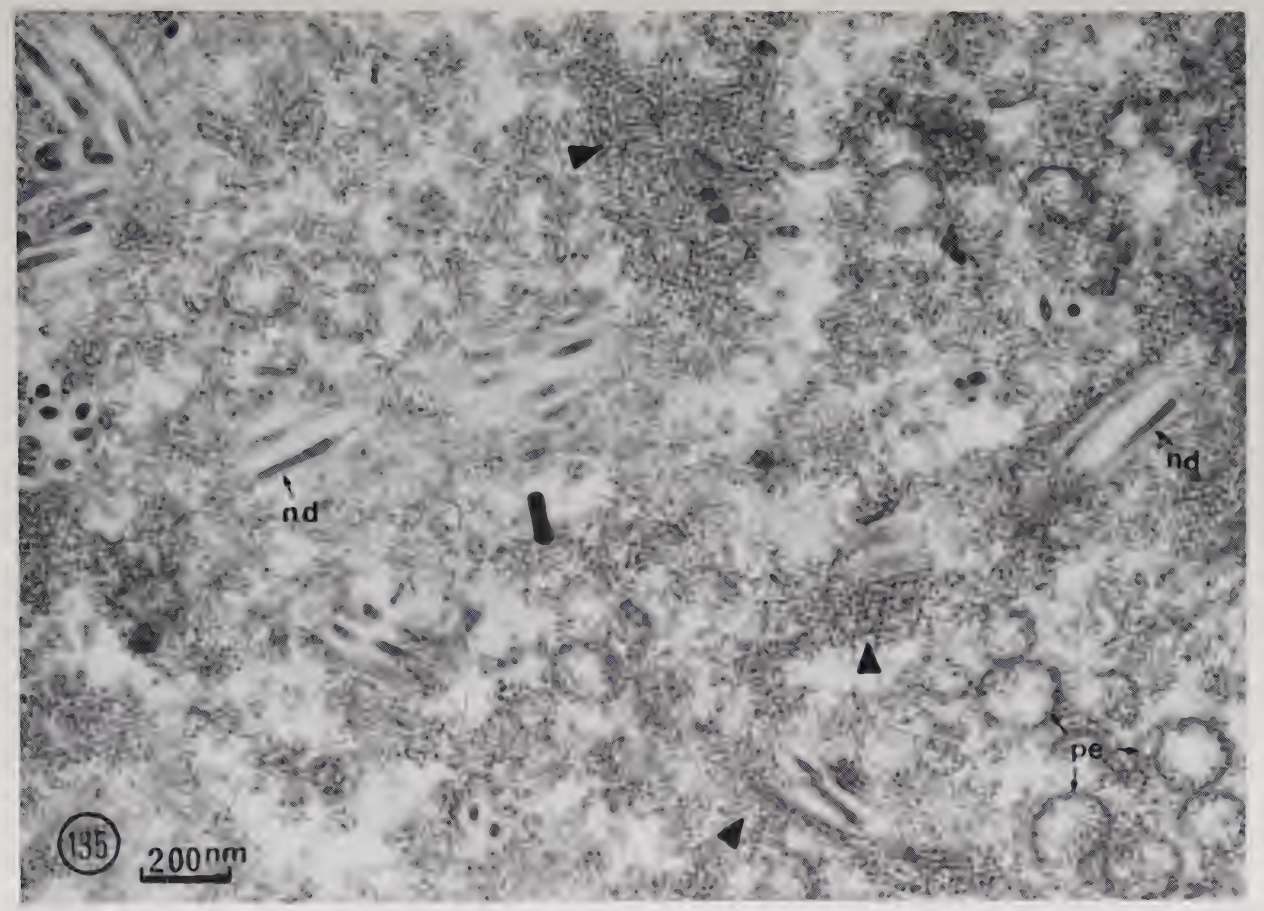

CY
mn
N
134
500nm

PLANCHE XLIII

Virose à *Baculovirus* de *Pisaura mirabilis*.

Fig. 135. : Portion d'un viroplasme à un stade précoce. Les nucléocapsides droites (nd) s'assemblent au sein d'un matériel granulo-fibrillaire (▶). Quelques structures membranaires rappelant les précurseurs d'enveloppe de *Baculovirus* sont visibles (pe). X 56000.

Fig. 136. : Enveloppement des nucleocapsides. L'enveloppement des nucléocapsides droites (nd) débute à l'une de leurs extrémités (▶). A ce stade, en section transversale, on n'observe qu'une seule coupe de la nucleocapside dans l'enveloppe. pe. : précurseur d'enveloppe. X 80000.


nd
nd
pe
135
200nm

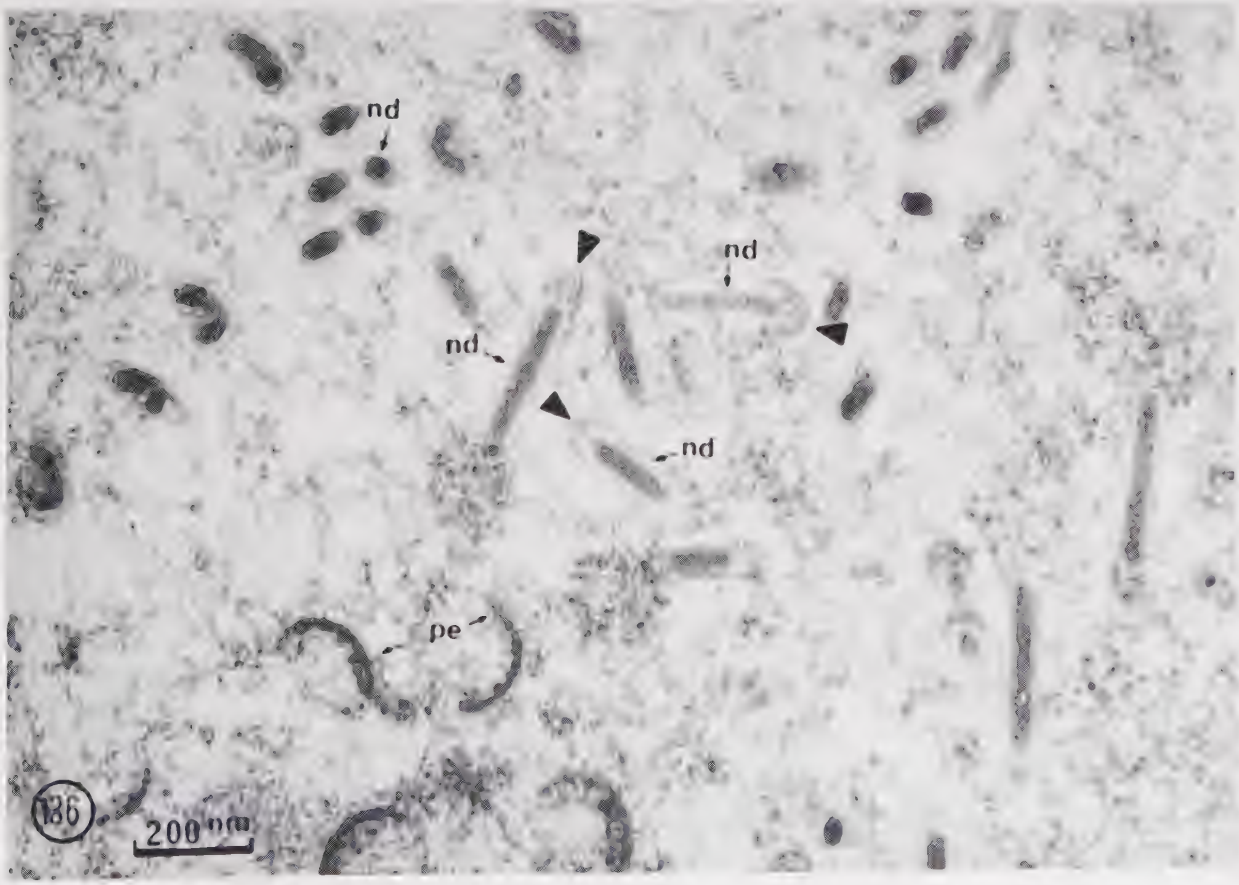

nd
nd
nd
nd
pe
136
200nm

PLANCHE XLIV

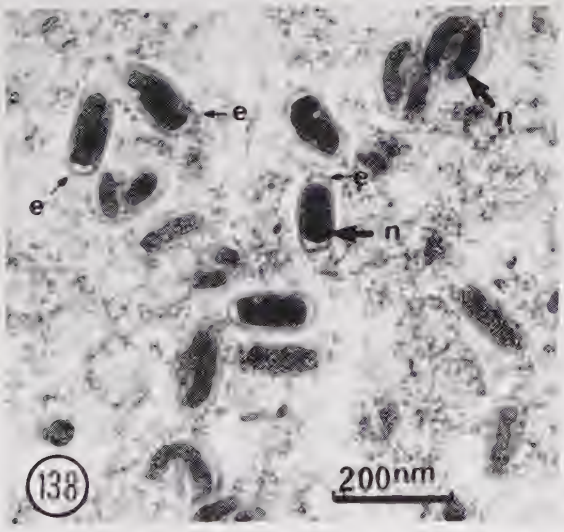
Virose à *Baculovirus* de *Pisaura mirabilis*.

Fig. 137. : L'enveloppe (e) du virion est visible autour des sections des nucléocapsides droites (nd) ou recourbées en fer à cheval. X 88000.

Fig. 138 - 139. : Viroplasmes en fin de virogenèse. Dans l'enveloppe (e), la nucléocapside (n) se présente sous la forme d'un fer à cheval (sections sagittales : ss), d'un bâtonnet court (sections longitudinales : sl), de deux cercles séparés (sections transversales : st). Fig. 138. : X 81000, Fig. 139 : X 43000.

Fig. 140. : Virions libres dans le cytoplasme (CY) en association avec des structures membranaires de type réticulum endoplasmique lisse. X 94000.

nd
e
e
e
137
200nm


e
e
e
n
n
138
200nm

CY
140
200 nm

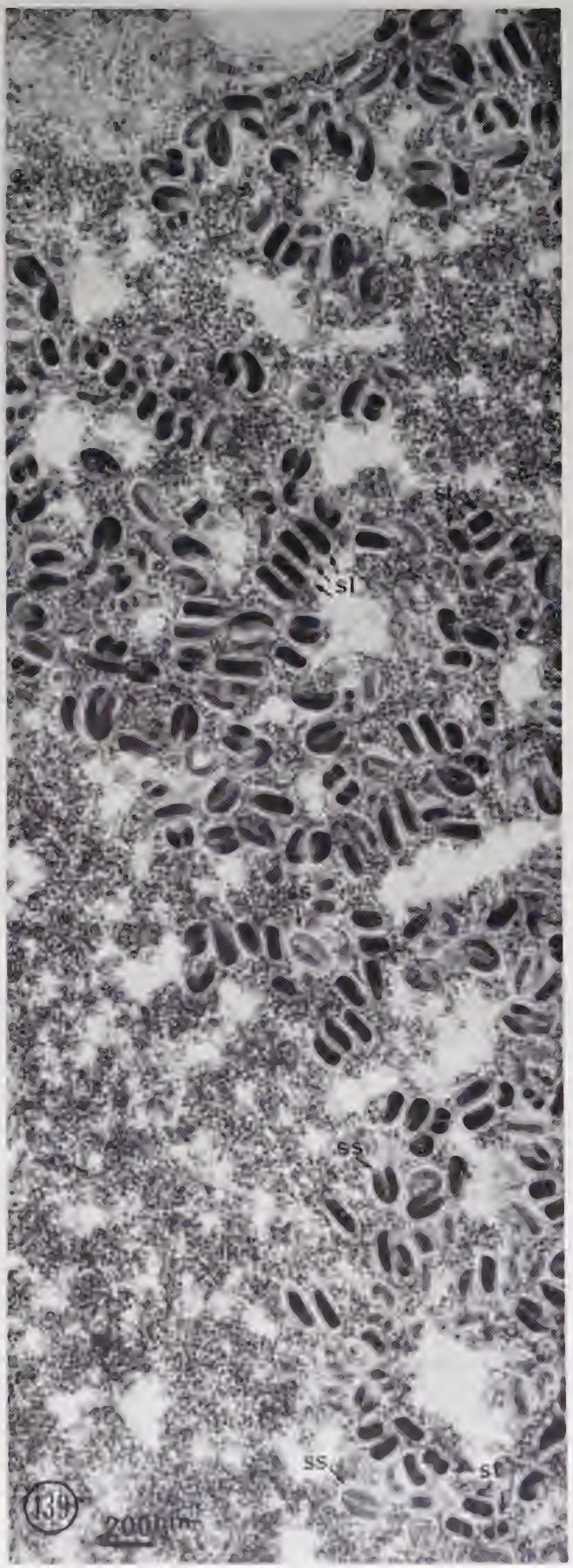

sl
sl
ss
ss
ss
139
200nm

PLANCHE XLV

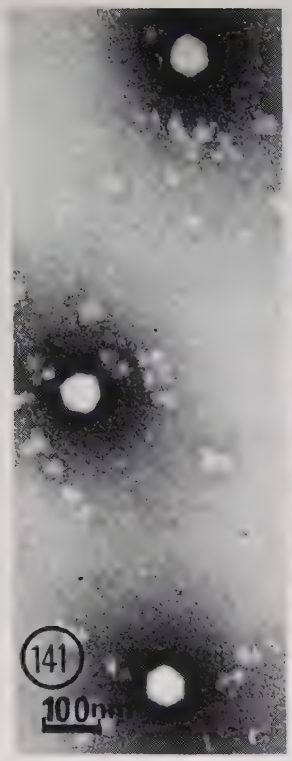
Virose à virus icosaédrique de *Pisaura mirabilis*.

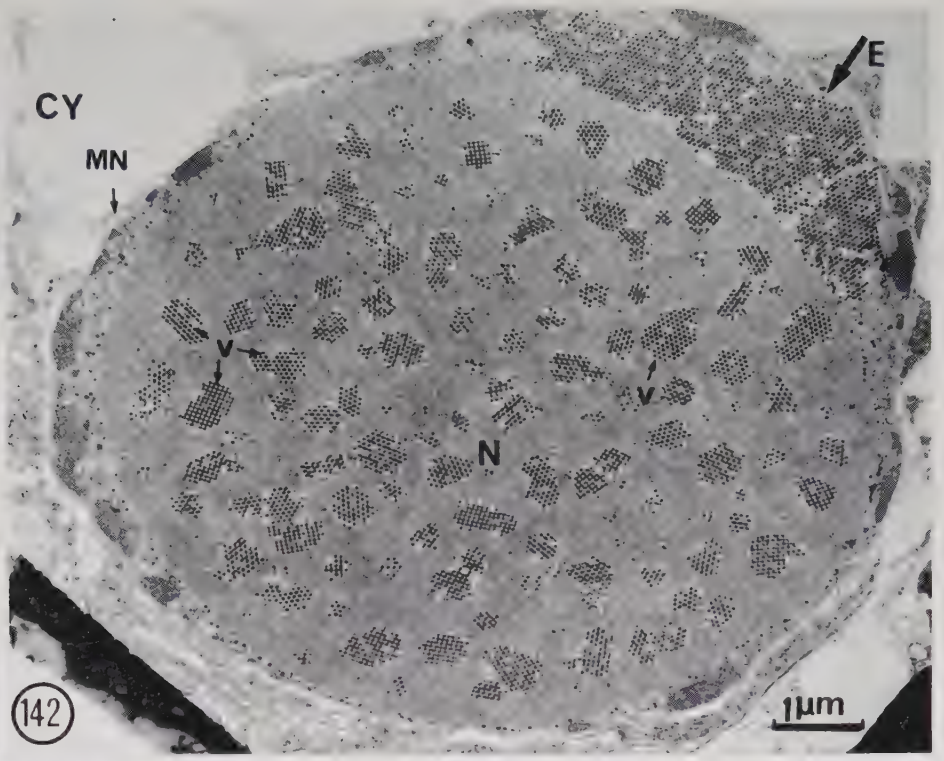
Fig. 141. : Particules virales constrastées négativement par l'APT. X 78000.

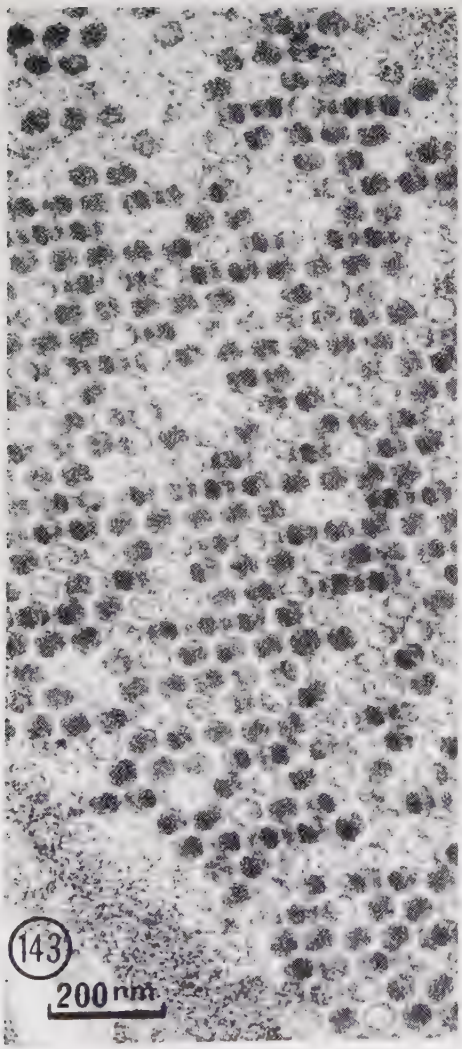
Fig. 142. : Section d'une cellule absorbante. Le noyau (N) est limité par la membrane nucléaire (MN). Les virus (V) absents du cytoplasme (CY) sont regroupés dans le noyau au sein d'un matériel amorphe. E : excroissance composée de virus à la surface du matériel d'inclusion. X 11800.

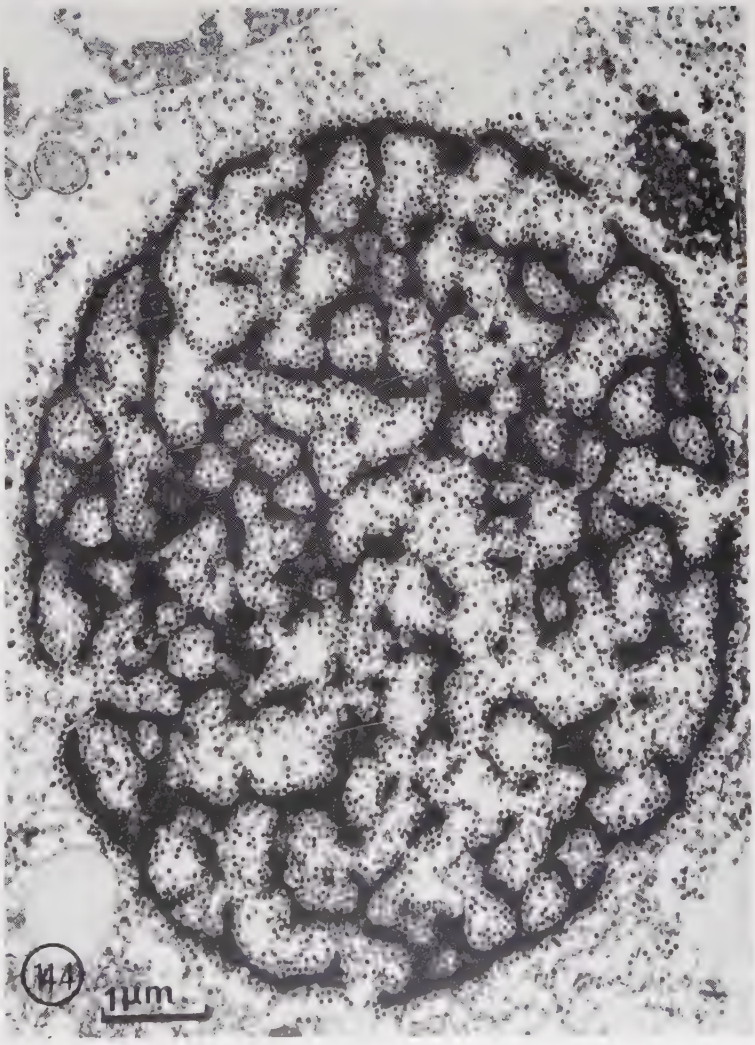
Fig. 143. : Détail d'une excroissance formée par l'accumulation de virus dans le nucléoplasme. De nombreuses particules apparemment vides sont visibles. X 75500.

Fig. 144. : Libération des virions dans la lumière d'un diverticule digestif. La membrane nucléaire a disparu ; le matériel amorphe où étaient inclus les virus semble s'être condensé ce qui permet la libération des particules virales. X 13500.


141
100nm


CY
MN
E
V
V
N
142
1µm


143
200nm


144
1µm

DISCUSSIONS ET CONCLUSIONS

Nos recherches systématiques des maladies infectieuses chez *Buthus occitanus* et chez l'araignée *Pisaura mirabilis* nous ont conduit à découvrir puis à étudier une virose et une rickettsiose chez le scorpion ainsi que deux viroses et trois rickettsioses chez l'araignée.

Nous allons tout d'abord rappeler les données qui permettent d'apporter une explication aux différences notées quant à la sensibilité des deux hôtes. En effet, ces maladies sont causées par des agents comparables par leur site de multiplication ou leur position systématique, mais, si le scorpion succombe toujours aux infections, chez l'araignée, seule une des rickettsioses est mortelle.

Les relations existantes entre la pathologie des deux arachnides et leur biologie seront ensuite examinées. Par rapport à la plupart des invertébrés sur lesquels travaillent les pathologistes, le scorpion et l'araignée se distinguent par leur mode de vie prédateur. La prédation les rend susceptibles d'être contaminés lors de l'ingestion de proies malades ; elle entraîne également un comportement associal qui limite les contacts intra-spécifiques et donc a priori l'extension des maladies dans les populations. Ces deux points nous amèneront à discuter de la spécificité des germes que nous avons isolés et du problème posé par le maintien des maladies dans les populations des deux arachnides.

Les particularités des rickettsies et virus isolés seront rappelées au cours d'une brève comparaison avec les agents du même type rencontrés chez d'autres invertébrés et chez les vertébrés. La découverte du nouveau groupe de rickettsies que constitue le genre *Porochlamydia* nous permettra d'essayer de dégager le sens de l'évolution chez les procaryotes intracellulaires.

Enfin nous rappellerons les particularités notées au cours de l'infection virale de la rickettsie *Porochlamydia buthi*.

DISCUSSION SUR LA SENSIBILITE DES HOTES.

Les maladies ne sont systématiquement mortelles que pour le scorpion, bien que les cellules hôtes de tous les agents infectieux -à l'exception de la *Rickettsiella*- soient principalement, sinon exclusivement, les cellules de l'hépatopancréas. La virulence des virus et des procaryotes ne peut donc pas être considérée comme un caractère intrinsèque de ces agents et la gravité de l'infection pour l'hôte doit être, pour une très grande part, fonction de la physiologie de l'hôte lui-même.

L'histopathologie révèle que l'hépatopancréas des araignées n'est jamais détruit alors que chez le scorpion il disparaît progressivement.

La réponse des cellules à la présence des germes diffère donc profondément d'un animal à l'autre même lorsqu'il s'agit de germes très voisins tels que *P. buthi buthi* et *P. buthi pisauri*. Avant de voir ce qui peut entraîner la lyse des cellules chez le scorpion, on peut déjà dire que la survie des animaux est liée aux processus qui permettent le maintien d'un tube digestif fonctionnel. Inexistants ou insuffisants chez le scorpion, ces processus comprennent chez l'araignée une élimination des germes par décapitation des cellules, une expulsion des noyaux infectés et la régénération des cellules détruites.

L'action cytophatogène de *P. buthi buthi* qui s'oppose à la tolérance des cellules de l'araignée vis-à-vis de *P. buthi pisauri* semble également être une conséquence des caractéristiques des cellules hôtes. En comparant les vacuoles de développement et les corps initiaux des deux germes, on constate que la forme des corps initiaux de *P. buthi buthi* est semblable à celle présentée par *P. buthi pisauri* lorsque les vacuoles de développement de cette dernière sont ouvertes. Il semble donc que *P. buthi buthi* se développe dans des vacuoles dont le tonoplasme est lésé ou suffisamment perméable pour permettre des échanges très importants entre le milieu intravacuolaire et le cytoplasme. L'action cytopathogène de *P. buthi buthi* est à notre avis la conséquence de la

désorganisation du cytoplasme due, soit à l'ouverture des vacuoles, soit à la libération par ces dernières de matériel toxique pour le cytoplasme et normalement renfermé dans le milieu intravacuolaire.

L'action de *Rickettsiella sp.* s'oppose à celle des deux *Porochlamydia* chez *P. mirabilis*. Dans les trois rickettsioses, il n'y a pas d'action cytopathogène. La mort de l'animal ne peut être mise en relation qu'avec le développement de *Rickettsiella sp.*, qui s'étend à la quasi totalité des tissus. Cette infection généralisée, conséquence d'une non spécificité cellulaire du germe, empêche tout mécanisme de compensation au cours du développement du microorganisme.

PROBLEMES LIES AU MODE DE VIE DES HOTES.

La prédation chez les deux arachnides entraîne la possibilité pour ces animaux d'ingérer fréquemment des agents microbiens contenus dans des proies malades. Elle a également pour corollaire un comportement asocial qui limite les contacts intra-spécifiques et diminue les possibilités de transmission horizontale des germes. Nous allons rappeler les éléments apportés par nos études et nos observations en relation avec la spécificité d'hôte des agents infectieux isolés chez les prédateurs et le maintien des maladies dans leurs populations.

Spécificité des germes.

Deux séries de données permettent d'estimer la spécificité des germes en l'absence d'études expérimentales complètes. Ce sont leur pouvoir infectieux et la fréquence naturelle des maladies auxquelles ils sont associés.

Si l'on utilise un mode de contamination naturel tel que l'ingestion des agents infectieux, 6 des maladies sont reproduites avec un pourcentage de réussite proche de 100 % et une seule, la rickettsiose à *Rickettsiella sp.*, avec un pourcentage inférieur à 10 %. Si l'on considère les fréquences naturelles de ces maladies, la rickettsiose précédente n'a été trouvée que chez moins de 0,3 % des individus et ce, une

seule année, alors que les 6 autres maladies atteignent 3 à 15 % des individus sans variation notable de ce pourcentage d'une année sur l'autre. Elles se maintiennent à un niveau relativement élevé et peuvent être considérées, a priori, comme spécifiques des populations languedociennes de *B. occitanus* et de *P. mirabilis* en l'absence d'information quant à leur développement chez d'autres invertébrés.

Il faut noter que les probabilités de rencontre des animaux sains avec les germes se situent entre 0,03 et 0,15 puisque leur ingestion est obligatoirement suivie du développement de la maladie.

Si nous postulons que dans le cas de la rickettsiose à *Rickettsiella*, les probabilités de rencontre germe-hôte ne sont pas plus élevées, nous voyons que la maladie ne peut se maintenir dans la population puisque le nombre des animaux infectés sera 10 fois plus faible à chaque transmission en raison du faible pouvoir infectieux du germe. L'existence de la *Rickettsiella* est donc liée à son développement chez un autre hôte et nous considérons donc cette maladie comme accidentelle, liée au régime alimentaire de l'araignée. Capturant un certain nombre de proies malades, les araignées sont donc susceptibles, dans le cas de germes peu spécifiques comme les *Rickettsiella*, de contracter des infections étrangères à l'espèce.

De telles maladies accidentelles ont déjà été rencontrées, à notre avis, dans un autre groupe de prédateurs : les coléoptères Carabidae. Dans ce groupe, en effet, Sutter et Kirk (1967) puis Carter et Luff (1977) notent la présence d'animaux atteints de rickettsiose à *Rickettsiella*. Le succès des essais de transmission de ces germes à d'autres insectes réalisés par Carter et Luff, montrent leur absence de spécificité vis-à-vis des Carabidae. De plus, le nombre d'animaux malades récoltés permet d'estimer que la maladie touche moins de 1 % des individus de ces populations. Ces deux faits permettent donc de penser que les germes en question se développent accidentellement chez ces insectes prédateurs.

Bien qu'il n'y ait aucune donnée de ce type concernant la *Rickettsiella* de l'araignée *Argyrodes gibbosus* (Meynadier et coll., 1974), nous pensons, par analogie, qu'elle est également accidentelle chez cet arachnide.

Les maladies non spécifiques de prédateurs peuvent ainsi jouer un rôle non négligeable dans la dissémination des germes. Dans le cas

présent, la maladie est de longue durée ce qui associé à la localisation du développement microbien au tissu digestif, entraîne une diffusion importante dans le temps et dans l'espace des particules infectieuses de la *Rickettsiella*. La rareté de telles maladies accidentelles permet de supposer que l'état sanitaire des proies ne joue qu'un très faible rôle dans la régulation des populations d'arthropodes prédateurs.

Maintien des maladies dans les populations.

Un facteur défavorable à l'extension des maladies est constitué, a priori, par les densités de population relativement faibles et le comportement asocial des arachnides qui limitent les contacts intraspécifiques au sein des populations. En effet, chez d'autres arthropodes, comme les insectes, il est établi que le nombre et la distribution spatiale des hôtes est un facteur important intervenant dans la dymanique des maladies. La proportion des animaux malades s'accroît, en effet, avec l'augmentation de la densité des populations de l'hôte (Tanada, 1973).

Chez les arachnides, où l'on note un maintien au même niveau d'une année sur l'autre des enzooties, le facteur défavorable lié au nombre et à la distribution des individus doit donc être contrebalancé. Certaines données apportées par nos études ou relatives à la biologie des hôtes peuvent être considérées comme des facteurs favorables.

Tout d'abord, les maladies sont toutes intestinales, ce qui se traduit par une libération des germes dans le milieu extérieur par l'intermédiaire des déjections. Cette dissémination s'étend sur plusieurs mois en raison de la longue durée d'évolution des affections non létales ou seulement mortelles à long terme. La dissémination spatiale des germes ainsi assurée par l'hôte va différer chez le scorpion et chez l'araignée.

Menant une vie errante, les araignées infectées vont disperser les germes dans la totalité du territoire occupé par la population. Les araignées saines se contamineront en buvant de l'eau souillée ou au cours de séance de nettoyage dans le cas de contamination par contact.

Il semble donc, la population occupant un territoire à peu près limité, que les probabilités pour l'hôte de rencontrer le germe seront principalement fonction du rapport entre la surface du milieu contaminé et la surface du territoire ainsi que du nombre d'individus occupant cet espace, à un moment donné. Compte tenu de l'élargissement des foyers ponctuels constitués par les déjections, sous l'action de facteurs abiotiques tels que la pluie et le vent par exemple, la probabilité de rencontre du germe et de son hôte est donc suffisamment élevé pour que l'endémie subsiste.

Le problème posé par le passage d'une génération à l'autre de la maladie semble être favorisé par le fait que les femelles infectées ont des pontes fertiles et que, restant en compagnie des jeunes un certain temps, ceux-ci sont fortement susceptibles de se contaminer avant de quitter la toile pouponnière pour se disperser sur le territoire.

Les scorpions sont, eux plus sédentaires. Ils occupent un territoire individuel où ils ont un abri constitué par un terrier sous une pierre. La dispersion à partir d'un individu malade se limite donc, de son vivant, à son territoire et à l'abri qu'il occupe. A notre avis la contamination de nouveaux individus se fera essentiellement lors de l'occupation par un autre scorpion d'un territoire contaminé, c'est-à-dire à la suite, soit de la mort, soit du départ de l'occupant malade. Elle sera donc liée au déplacement des individus au sein de la population. Le comportement des animaux à la suite de l'exuviation contribue à augmenter les chances d'extension des maladies. L'examen des exuvies trouvées sur le terrain indique, en effet, que l'animal quitte généralement son terrier à la suite de la mue et qu'il est donc alors susceptible d'aller s'installer dans un territoire contaminé.

Nous considérons donc que, chez le scorpion, les endémies doivent être principalement dues à l'existence de foyers infectieux constitués par certains territoires individuels. La multiplication des foyers infectieux résulte du déplacement des animaux malades et vraisemblablement de la dispersion assurée par les détritivores se nourrissant des cadavres infectieux. Le problème du passage d'une génération à l'autre ne se pose pas chez cet animal puisqu'à tout moment se ren-

contrent des animaux aux divers stades et que les scorpions vivent plusieurs années. Le nombre d'abris disponibles sur le territoire de la population étant fini, le taux des endémismes sera en partie fonction du pourcentage d'abris occupés sur un territoire, donc de la densité de population.

AFFINITES DES AGENTS INFECTIEUX ISOLES CHEZ LES DEUX ARACHNIDES ET ADAPTATION AU PARASITISME INTRACELLULAIRE.

Notre recherche des maladies infectieuses chez *P. mirabilis* et chez *B. occitanus* est la première qui ait été faite chez des arachnides non acariens. Elle a conduit à l'étude de trois virus et de quatre rickettsies qui s'ajoutent aux deux rickettsies signalées chez d'autres araignées (Osaki, 1973 ; Meynadier et coll., 1974). Bien que ces données ne concernent que quatre représentants de la classe des arachnides, ce qui peut donner une fausse idée de la pathologie dans ce groupe en raison du faible nombre d'espèces prospectées, nous allons essayer de voir les affinités de ces divers agents avec ceux rencontrés chez d'autres invertébrés et chez les vertébrés.

1) Les virus.

Parmi les trois virus étudiés, seul le virus cytoplasmique du scorpion et le virus ovoïde de l'araignée peuvent être rapprochés avec une quasi certitude de deux familles bien définies : celle des Reoviridae et celle des Baculoviridae.

Le virus du scorpion *Buthus occitanus*.

Ce virus a un développement intracytoplasmique. Icosaédrique, de 60 à 70 nm de diamètre, il possède une double capside et son acide nucléique est de l'ARN. Ces caractères permettent de le rapprocher des virus de la famille des Reoviridae. Il n'est jamais inclus dans un polyèdre ce qui l'éloigne des Reoviridae d'insectes (virus des polyèdroses cytoplasmiques). En revanche, sa taille ainsi que son développement dans des cellules digestives le repporchent des *Rotavirus* , agents des diar-

rhées infantiles de nombreux mammifères (Derbyshire et Woode, 1978). Des formations tubulaires identiques à celles associées au virus du scorpion ont d'ailleurs été signalées chez certains représentants de ce groupe de virus (Banfield et coll., 1968 ; Holmes et coll., 1975 ; Flewett et Boxall, 1976). Son étude biochimique complète et son étude immunologique devraient permettre de vérifier ses affinités avec le groupe des *Rotavirus*.

Le virus ovoïde de *Pisaura mirabilis*.

Intranucléaire, ce virus est enveloppé et possède une nucléocapside en forme de bâtonnet. Son architecture permet de considérer qu'il s'agit d'un *Baculovirus*. Non inclus, il ferait parti du sous groupe C dans la famille des Baculoviridae à côté de virus décrits chez les insectes (Huger, 1966 ; Gouranton, 1972 ; Kitajima et coll., 1978), les crustacés (Bazin et coll., 1974 ; Pappalardo et Bonami, 1979) et les acariens (Bird, 1967 ; Reed et Hall, 1972). Il y occuperait cependant une position particulière en raison de la forme en fer à cheval de sa nucléopcapside.

Le virus icosaédrique de *Pisaura mirabilis*.

Intranucléaire, ce virus de taille moyenne (55 à 70 nm) ne présente aucune similitude avec un des groupes de virus connus chez les invertébrés. Sa taille et son développement permettraient de le rapprocher des *Adenovirus* de vertébrés, cependant l'absence de capsomères visibles et de projections ainsi que son "inclusion" au cours de la virogenèse, rendent très hypothétique son appartenance à cette famille.

2) Les rickettsies.

Les rickettsies rencontrées chez les araignées et les scorpions appartiennent, soit au genre *Rickettsiella*, soit au genre *Porochlamydia*.

Le genre *Rickettsiella* était connu jusqu'à présent chez d'autres arthropodes : insectes et crustacés. Chez *P. mirabilis*, *Rickettsiella sp.* se développe, à notre avis accidentellement et il en serait de même de la *Rickettsiella* décrite par Meynadier et coll. (1974) chez l'araignée *Argyrodes gibbosus*.

Le genre *Porochlamydia* est bien représenté chez les arachnides. Outre les trois microorganismes que nous avons étudiés, un microorganisme très proche de *P. buthi* a été décrit au Japon chez l'araignée *Coelotes luctuosus* (Osaki, 1973). Il représente vraisemblablement une troisième sous-espèce de *P. buthi* d'après ses caractères structuraux. Le genre *Porochlamydia* semble également exister chez les insectes ; il apparait que le microorganisme connu sous le nom de *"Rickettsiella chironomi"* (Weiser et Zizka, 1968 ; Götz, 1972) qui se développe chez certains diptères, puisse être placé parmi les *Porochlamydia*. D'après Federici (communication personnelle), *"Rickettsiella chironomi"* possède en effet, le même type d'organisation et de développement que les *Porochlamydia* et la paroi de ses corps élémentaires présente nettement l'aspect perforé caractéristique de ce genre de procaryote.

Le genre *Porochlamydia* qui se rencontre donc à la fois chez des arachnides en Europe et au Japon et chez les diptères en Europe et aux Etats-Unis, a donc une répartition vraisemblablement mondiale. Son développement chez les animaux aussi différents que les diptères et les arachnides pose cependant le problème de son origine et de son évolution. Il est impossible de dire si, à l'origine, le genre était inféodé aux arachnides ou aux insectes.

3) Adaptation au parasitisme intracellulaire.

La comparaison des divers groupes de rickettsies à cycle permet d'aborder le problème de l'évolution de ces procaryotes intracellulaires.

En dehors de leur métabolisme qui dépend partiellement de celui des cellules hôtes, deux caractères structuraux différencient les procaryotes intracellulaires à cycle des autres rickettsies et des bactéries gram-négatif dont on les rapproche : la paroi des formes végétatives et la structure des formes de résistance qui apparaissent au cours du cycle. Ces deux caractères sont liés au parasitisme intracellulaire :

- le développement intravacuolaire des microorganismes semble avoir eu pour conséquence la perte de la structure rigide de la paroi qui existe chez les bactéries libres ; cette altération s'observe actuel-

lement au cours de la phase végétative des germes dans les genres *Chlamydia* et *Porochlamydia* et, à un moindre degré, dans le genre *Rickettsiella*. Elle permettrait d'augmenter les échanges du microorganisme avec le milieu ambiant d'après certains auteurs dont Kordova (1978) ;

- incapables de résister sous leur forme végétative aux conditions extérieures, ces microorganismes doivent évoluer en fin de cycle vers une forme infectieuse plus résistante. Cette maturation se traduit par des modifications plus ou moins importantes de leur structure : acquisition d'une paroi plus rigide et condensation du cytoplasme et du matériel nucléaire.

Les *Rickettsiella*, les *Chlamydia* et les *Porochlamydia* présentent, à des degrés divers, ces diverses adaptations. Nous inclurons à la fin de cette discussion *Coxiella burneti* qui, sans avoir de cycle défini, semble constituer une étape intermédiaire dans l'évolution vers ce type de procaryote. Certaines observations, en effet, font état de deux formes chez les microorganismes du genre *Coxiella* (Rosenberg et Kordova, 1960 ; Burton et coll., 1971).

Les *Rickettsiella* sont, à notre avis, les moins évoluées. La paroi des formes végétatives reste suffisamment rigide pour que ces microorganismes conservent un aspect bacilliforme et la restructuration peu importante qui conduit aux formes de résistance, se traduit seulement par une condensation du nucléoïde et du matériel cytoplasmique. Par ailleurs, la rigidité des corps élémentaires ne semble pas suffisante pour éviter des déformations de la paroi comme le suggère d'une part, les examens des particules contrastées négativement et d'autre part, les coupes des vacuoles âgées de certaines *Rickettsiella* où les corps élémentaires en section transversale ont un aspect polyédrique. Cette déformation est due au tassement des particules les unes contre les autres (Federici, communication personnelle).

Les *Porochlamydia* semblent, elles, présenter l'adaptation maximum au parasitisme intracellulaire. D'une part, le pléomorphisme des formes végétatives traduit l'altération complète de la paroi incapable de donner une forme définie au microorganisme, d'autre part, la restructuration en vue de l'obtention des formes de résistance est extrêmement importante. Il y a séparation très nette du matériel nucléaire et du matériel cytoplasmique, redistribution de ces deux composantes à l'inté-

rieur des particules et une telle réduction du cytoplasme que les ribosomes se disposent selon un arrangement paracristallin. L'acquisition de la rigidité des limites cellulaires se fait par une modification de la paroi qui perd son aspect de membrane unitaire et paraît être constituée de sous-unités régulièrement disposées. Il est à noter au sujet de cette restructuration qu'elle débute de manière très nette au niveau du matériel nucléaire du microorganisme. Il n'est pas impossible également que la rigidité des particules soit accrue par la présence du nucléoïde en position superficielle.

Les *Chlamydia* se caractérisent quant à elles par une altération de la paroi des formes végétatives identique à celle des *Porochlamydia* mais par des formes de résistance à notre avis moins évoluées que chez ces dernières. La séparation nucléoïde-cytoplasme semble totale et il y a une latéralisation du nucléoïde. Cependant, la condensation du cytoplasme semble moins importante que celle notée chez les *Porochlamydia* et même chez les *Rickettsiella*. Les corps élémentaires des *Chalmydia* présentent l'aspect des corps intermédiaires des *Porochlamydia* dans lesquels la réduction du cytoplasme n'est pas achevée. Les modifications des limites cellulaires leur confèrent une certaine résistance mise en évidence par Costerton et coll. (1974) mais la forme assez irrégulière de ces particules semble indiquer que leur rigidité n'est pas maximum. L'aspect "inachevé" des formes de résistance des *Chlamydia* est peut être à mettre en relation avec le mode de transmission existant pour ce type de rickettsiose, transmission qui se fait principalement d'hôte à hôte, c'est-à-dire sans passage important par le milieu extérieur. Il est possible que l'évolution des formes de résistance se soit arrêtée à un niveau suffisant pour les conditions de transmission requises ou, hypothèse également possible, qu'après avoir présenté des formes de résistance plus évoluées, les *Chlamydia* les aient perdues à la suite de nouvelles possibilités de dissémination au sein des populations sensibles (transmission verticale de mère à foetus, ou horizontale par contact (Goldbloom, 1978 ; Schachter, 1978).

Enfin, *Coxiella burneti* qui appartient à l'ordre des Rickettsiales a de même que *Rickettsia sennetsu* un développement intravacuolaire et semble présenter un début de différenciation en forme végétative et en forme de résistance (Kordova, 1978). Bien que les données concernant ce

microorganisme soient assez contradictoires selon les auteurs, il semble cependant qu'il se présente sous deux types morphologiques : l'un, de petites taille avec un nucléoïde dense, l'autre, de plus grande taille, plus arrondi, avec un nucléoïde assez lâche (Rosenberg et Kordova, 1960). Deux types de particules ont également été obtenus par purification (Wiebe et coll., 1972) mais tous deux sont infectieux. Bien que ces deux types n'aient pas été observés par tous les auteurs, dont Eb et coll. (1976), il est possible que chez *C. burneti* existe un début de différentiation du microorganisme tendant vers l'établissement d'un cycle avec forme de résistance et forme végétative.

En résumé, l'adaptation au parasitisme intravacuolaire des procaryotes tend vers l'acquisition de deux caractères apparemment opposés qui sont : la présence d'une paroi altérée ce qui facilite les échanges avec le milieu ambiant et le maintien ou la réacquisition d'une paroi rigide permettant la survie des germes en dehors des cellules hôtes. Ces caractères adaptatifs existent à des degrés divers chez les procaryotes à développement intravacuolaire actuellement connus. Le degré de rigidité de la paroi de leurs formes végétatives permet de separer les *Porochlamydia* et les *Chlamydia* des *Rickettsiella* et des *Coxiella*. Cependant, en raison de la possibilité d'existence de phénomènes de convergence et de parallélisme, on ne peut pas reconnaître dans ces groupes de liens de parenté.

Il est à noter que la diversité morphologique au sein de ces genres est très inégale : inexistante pour l'instant chez trois d'entre eux, elle est très importante dans le genre *Porochlamydia* où l'on peut constater qu'il y a eu une radiation évolutive importante.

INFECTION VIRALE DE LA RICKETTSIE *POROCHLAMYDIA BUTHI*.

Le développement d'un phage chez l'un des procaryotes intracellulaire représente un des premiers cas connus d'hyperparasitisme microbien. Bien que d'après la classification d'Ackerman (1969) le phage puisse être placé dans le groupe C1 d'après son architecture et la nature de son acide nucléique, il se caractérise par rapport aux autres phages par l'existence d'une sorte de cycle au cours de sa multiplication.

Ce cycle comprend une phase durant laquelle il est tempéré et une phase durant laquelle il est virulent. La succession de ces deux phases représente en quelque sorte une adaptation du virus au développement intracellulaire et au cycle de son hôte. La phase durant laquelle il se multiplie sans qu'il y ait morphogenèse virale permet, en effet, la contamination de tous les corps initiaux d'une microcolonie et la morphogenèse finale est suivie de la production d'un grand nombre de particules virales qui seront susceptibles d'infecter hors des cellules les formes de résistance du microorganisme. Ce processus infectieux évite donc au virus d'une part, la nécessité de pénétrer dans les cellules puis dans les vacuoles de développment de *P. luthi* et d'autre part, d'avoir à résister dans le milieu extérieur puisque son génôme est alors protégé à l'intérieur des corps élémentaires.

Nous ne pouvons pas dire actuellement si ce "cycle" est la règle chez les phages s'attaquant aux procaryotes intracellulaires puisque dans les travaux signalant de tels virus (Maramorosch et coll., 1975 ; Harshbarger et coll., 1977 ; Buchanan, 1978 ; Wright et coll., 1978) il n'est pas fait allusion à leur processus infectieux.

CONCLUSIONS GENERALES

Les résultats relatés dans ce mémoire montrent que les arachnides, de même que les autres arthropodes, sont sujets à des attaques microbiennes spécifiques et que en tant que prédateurs, ils peuvent également être sujets à des maladies accidentelles et contribuer ainsi à la dissémination de germes non spécifiques inféodés à d'autres espèces animales.

En plus de l'élargissement à la pathologie des invertébrés au groupe des arachnides non acariens, nos études ont conduit à découvrir un nouveau groupe de procaryotes. La comparaison des diverses rickettsies isolées et de celles précédemment connues a servi de support à des hypothèses sur l'origine des corps géants dans ce groupe de microorganismes et sur le sens de l'évolution des procaryotes intravacuolaires.

En raison de l'originalité présentée par les germes isolés, il est vraisemblable que l'extension des recherches pathologiques à d'autres groupes d'invertébrés devrait amener une augmentation du nombre et de la diversité systématique de leurs agents infectieux. Il serait alors possible de définir les relations et associations existantes entre ces agents et, d'une part les groupes systématiques, d'autre part les groupes d'animaux ayant le même mode de vie ou le même biotope. Cette distinction entre l'hôte considéré du point de vue de la systématique et l'hôte faisant partie d'un écosystème pourrait permettre de séparer les germes associés à chacun de ces deux groupes et ainsi aider à éclaircir le problème posé par l'origine de certains germes et celui de leur évolution phylétique.

Enfin, certaines de nos observations conduisent à penser que la pathologie des invertébrés est trop souvent réduite à la seule étude de l'agent infectieux. Les sensibilités variables des hôtes et l'action de ces derniers sur les parasites montrent, en effet, que la disjonction du complexe parasite-hôte a pour conséquence de négliger l'importance de l'hôte dans l'évolution d'une maladie. Les études pathologiques devraient donc être replacées dans un cadre plus général en élargissant les investigations aux données physiologiques et métaboliques. Cet élargissement devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes régissant certains phénomènes comme les latences et les développements de type épidémique.

BIBLIOGRAPHIE

ACKERMANN H.W., 1969. Bacteriophages. Propriétés et premières étapes d'une classification. *Path. Biol., 17* : 1003-1024.

ADAMS J.R., GOODWIN R.H. et WILCOX T.A., 1977. Electron microscopic investigations on invasion and replication of insect. *Baculovirus in vivo* and *in vitro. J. Microscopie Biol. Cell., 28* : 261-268.

AIZAWA K., 1971. Structure of polyhedra and virus particles of the cytoplasmic polyhedrosis. In " the cytoplasmic polyhedrosis of the silk worm". (Aruga H. et Tanada Y. eds). University of Tokyo Press, Tokyo: 23-26.

ARNOTT H.J. et SMITH K.M., 1968. An ultrastructural study of the development of a granulosis in the cells of the moth *Plodia interpunctella* (Hbn). *J. Ultrastruct. Res., 21* : 251-268.

ARNOTT H.W., SMITH K.M. et FULLILOVE S.L., 1968. Ultrastructure of a cytoplasmic polydedrosis virus affecting the monarch butterfly *Danaus plexippus. J. Ultrastruct. Res., 24* : 479-507.

AUBER M., 1963. Reproduction et croissance de *Buthus occitanus* Amx. *Ann. Sc. Nat., Zool., Paris, 12* : 273-286.

AVAKIAN A.A., GUDIMA O.S. et ALIMOV Z.H., 1973. Electron microscopic study of *Rickettsia canada* in the cells of tissue cultures. *ZH. Mikrobiol. Epidemiol. Immunol., 3* : 3-6.

AVERY S.W., JOUVENAZ D.P., BANKS W.A. et ANTHONY D.W., 1977. Virus-like particles in a fire ant, *Solenopsis sp.* (Hymenoptera : formicidae) from Brazil. *Fla. Entomol., 60* : 17-20.

BANFIELD W.G., KASNIC G. et BLACKWELL J.H., 1968. Further observations on the virus of epizootic Diarrhea of infant mice. An electron microscopic study. *Virology, 36* : 411-421.

BAYER M.E. et REMSEN C.L., 1970. Structure of *Escherichia coli* after freeze-etching. *J. Bacteriol., 101* : 304-313.

BAZIN F., MONSARRAT P., BONAMI J.R., CROIZIER G., MEYNADIER G., QUIOT J.M. et VAGO C., 1974. Particules virales de type *Baculovirus* observées chez le crabe *Carcinus maenas. Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 38* : 205-208.

BERNHARD W., 1968. Une méthode de coloration régressive à l'usage de la microscopie électronique. *C.R. Acad. Sc. Paris, 267, D* : 2170-2173.

BIRD F.T., 1967. A virus disease of the European red mite *Panonychus ulmi* (Koch). *Can. J. Microbiol., 13* : 11-31.

BONAMI J.R., COMPS M. et VEYRUNES J.C., 1975. Etude histopathologique et ultrastructurale de la paralysie virale du crabe *Macropipus depurator* L. *Rev. Trav. Inst. Pêches marit., 40* : 139-146.

BONARIC J.C., 1974. Le développement post-embryonnaire de *Pisaura mirabilis* Cl. (Araneae, Pisauridae). *C.R. Acad. Sc. Paris, D, 278* : 3227-3230.

BONARIC J.C., 1975. Utilisation des barèmes trichobothriotaxiques comme critère d'âge chez *Pisaura mirabilis* Cl. (Araneae, Pisauridae). *Ann. Sc. Nat., Zool. Paris, 17* : 521-534.

BONARIC J.C., 1977. Action de l'ecdystérone sur la réduction de durée de la période d'intermue chez *Pisaura mirabilis* Cl. (Araneae, Pisauridae) : détermination de l'effet optimal par inoculation de concentrations croissantes. *Arch. Zool. exp. gen., 118* : 43-51.

BONNEFOY A.M., KOLENKINE X. et VAGO C., 1972. Particules d'allure virale chez les Hydres. *C.R. Acad. Sci., Paris, 275, D* : 2163-2165.

BRADLEY D.E., 1967. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bact. Rev., 31* : 230-314.

BRANTON D., BULLIVANT S., GILULA N.B., KARNOVSKY M.J., MOOR H., MUELHETHALER K., NORTHCOTE D.H., PACKER L., SATIR B., SATIR P., SPETH V., STAEHLIN L.A., STEERE R.L. et WEINSTEIN R.S, 1975. Freeze-etching nomenclature. *Science, 190* : 54-56.

BUCHANAN J.S., 1978. Cytological studies on a new species of rickettsia found in association with a phage in the digestive gland of a marine bivalve mollusc, *Tellina tenuis* (da Costa). *J. Fish. Dis., 1* : 27-43.

BURGDORFER W. et L.P. BRINTON, 1975. Mechanisms of transovarial infection of spotted fever rickettsiae in ticks. *Ann. N.Y. Acad. Sci., 266* : 61-72.

BURGDORFER W., SEXTON D.J., GERLOFF R.K., ANACKER R.L., PHILIP R.N. et THOMAS L.A., 1975. *Rhipicephalus sanguineus* : Vector of a new spotted fever group rickettsia in the United States. *Infec. Immun. 12* : 205-210.

BURTON P.R., KORDOVA N. et PARETSKY D., 1971. Electron microscopic studies of the rickettsia *Coxiella burneti* : entry , lysosomal response and fate of rickettsial DNA in L cells. *Can. J. Microbiol. 17* :499-502.

BYERS J.R. et WILKES A., 1970. A rickettsia-like microorganism in *Dalhbominus fuscipennis* (Zott.) (Hymenotera Eulophidae) : observations on its occurence and ultrastructure. *Canad. J. Zool., 48* : 959.

CARTER J.B. et LUFF M.L., 1977. Rickettsia-like organisms infecting *Harpalus rufipes* (Coleoptera : Carabidae). *J. Invertebr. Pathol., 30* : 29-101.

CORY J., YUNKER C.E., HOWARTH J.A., HOKAMA Y., HUGUES L.E., THOMAS L.A. et CLIFFORD C.M., 1975. Isolation of spotted fewer group and *Wolbachia*-like agents from field- collected materials by means of plaque formation in mammalian and mosquito cells. *Acta virol., 19* : 443-445.

COSTERTON J.W., INGRAM J.M. et CHENG K.J., 1974. Structure and function of the cell envelope of gram-negative bacteria. *Bact. Rev., 38* : 87-110.

CROIZIER G., 1976. Etude des formations protéiniques cristallines associées à certaines maladies microbiennes des insectes. Thèse *Doct. Sci. nat., Univ. Montpellier II, 1976,* 97 p.

CROIZIER G. et MEYNADIER G., 1971a. Recherches d'antigènes de groupe chez des rickettsies de la tribu des Wolbachiae par la technique d'agglutination des corps élémentaires. *Entomophaga, 16* : 11-17.

CROIZIER G. et MEYNADIER G., 1971b. Mise en évidence et comparaison d'antigènes extraits des formes géantes de trois *Rickettsiella* Philip. *Ann. Inst. Pasteur, 121* : 87-92.

CROIZIER G., MEYNADIER G., MOREL G. et CAPPONI M., 1975. Comparaison immunologique de quelques Wolbachiae et recherche de communauté antigénique avec d'autres membres de l'ordre des Rickettsiales. *Bull. Soc. Pathol. exot., 68* : 133-141.

DERBYSHIRE J.B. et WOODE G.N., 1978. Classification of Rotaviruses. Report from World Health Organisation/Food and Agriculture Organization. Comparative Virology Program. *J. Amer. Vet. Med. Ass., 173* : 519 521.

DEVAUCHELLE G. et VAGO C., 1971. Particules d'allure virale dans les cellules de l'estomac de la seiche *Sepia officinalis* L. (Mollusques, Céphalopodes). *C.R. Acad. Sci., 271, D* : 894-896.

DEVAUCHELLE G., MEYNADIER G. et VAGO C., 1972. Etude ultrastructurale du cycle de multiplication de *Rickettsiella melolonthae* (Krieg), Philip, dans les hémocytes de son hôte. *J. Ultrastruct. Res., 38* : 134-148.

DEVAUCHELLE G., VAGO C. et MEYNADIER G., 1971. Ultrastructure comparée de *Rickettsiella melolonthae* (Rickettsiales Wolbachiae) et de l'agent de la lymphogranulomatose vénérienne (Rickettsiales Chlamydiaceae). *C.R. Acad. Sci., 272* : 2972-2874.

DISCHE Z., 1930. Über einige nene charakteristische farbreaktionen der thymonukleïnsaure und eine mikromethod zur bestimmung derselben in tierischen organen mit hilfe dieser reaktionen. *Mikrochemie, 8* : 4-34.

DUBRAY G.J., 1975. Influence de la fixation sur la mise en évidence cytochimique des polysaccharides des bactéries du genre Brucella. *J. Microscopie, Biol. cell., 24* : 59-74.

DUTKY S.R. et GOODEN E.L., 1952. *Coxiella popilliae n. sp.* a rickettsia causing blue disease of Japanese beetle larvae. *J. Bacteriol., 63* : 743-750.

EB F., DEVAUCHELLE G., ORFILA J., 1972. Etude ultrastructurale de l'agent de la lymphogranulomatose vénérienne (Rickettsiales, Chlamydiaceae). *J. Microscopie, (Paris), 13* : 47-56.

EB F., ORFILA J. et DEVAUCHELLE G., 1973. Etude de *Chlamydia trachomatis*. Polymorphisme de l'agent du trachome en culturescellulaires. *Ann. Microbiol. Inst. Pasteur, 124 B* : 41-71.

EB F., ORFILA J. et LEFEBVRE J.F., 1976. Ultrastructure comparée de *Coxiella burneti* et de *Chlamydia psittaci* en culturescellulaires. *J. Microscopie Biol. Cell., 25* : 207-210.

EMERIT M. et BONARIC J.C., 1975. Contribution à l'étude du développement de l'appareil mécanorécepteur des araignées : la trichobothriotaxie de *Pisaura mirabilis* Cl. (Araneae, Pisauridae). *Zool. Jb. Anat., 94*: 358-374.

ENTWISTLE P.F. et ROBERTSON J.S., 1968. Rickettsiae pathogenic to two saturniid moths. *J. Invertebr. Pathol., 10* : 345-354.

ESCAIG J. et NICOLAS G., 1976. Cryo-fractures de matériel biologique réalisées à très basses températures en ultra-vide. *C.R. Acad. Sci. Paris, 283, D* : 1245-1248.

FEDERICI B.A., HAZARD E.I. et ANTHONY D.W., 1974. Rickettsia-like organism causing disease in a Crangonid amphipod from Florida. *Appl. Microbiol., 28* : 885-886.

FENNER F., 1968. The biology of animal viruses. *Academic Press, New York and London, 2* : 845 pp.

FENNER F., 1976. Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology, 7* 1-115.

FLEWETT T.H. et BOXALL E., 1976. The hunt for viruses in infections of the alimentory system : an immunoelectron-microscopical approach. *Clin. Gastroenterol., 5* 359-385.

GABE M., 1968. "Techniques histologiques". *Masson, Paris*, 1113 pp.

GILES K.W. et MYERS A., 1965. An improved diphenylamine method for the estimation of desoxyribonucleic acid. *Nature, 206* : 93.

GIROUD P. et GIROUD M.L., 1943. Agglutination des rickettsies, test de sero-protection et réaction d'hypersensibilité cutanée. *Bull. Soc. Path. exot., 28* : 84.

GOLDBLOOM R.B., 1978. Chlamydial pneumonia and human sexuality. *Can. Med. Ass. J., 119* : 1153.

GOTZ P., 1972. *Rickettsiella chironomi* : An unusual bacterial pathogen which reproduces by multiple cell division. *J. Invertebr. Pathol. 20* : 22-30.

GOURANTON J., 1972. Development of an intranuclear non occluded rod-shaped virus in some midgut cells of an adult insect, *Gyrinus natator* (Coleoptera). *J. Ultrastruct. Res., 39* : 281-294.

GYSIN J. et LE CORRELLER Y., 1969. Mycoses chez le scorpion *Androctonus australis* Hector. *Archs. Inst. Pasteur, Alger, 47* : 83-92.

HALL I.M. et BADGLEY M.E., 1957. A rickettsial disease of larvae of species of *Stethorus* caused by *Rickettsiella stethorae n. sp. J. Bacteriol., 74* :452-455.

HARRAP K.A., 1972. The structure of nuclear polyhedrosis viruses. III Virus assembly. *Virology, 50* : 133-139.

HARSHBARGER J.C., CHANG S.C. et OTTO S.V., 1977. Chlamydiae (with phages) mycoplasmes and rickettsia in Chesapeake Bay bivalves. *Science, 196*: 666-668.

HARTREE E.F., 1972. Détermination of protein : a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Ann. Biochem., 48* : 422-427.

HAYES W., The genetics of bacteria and their viruses. *Blackwell scientific publication, Oxford,* 740 pp.

HILL J., 1976. Molluscan viruses : their occurence, culture and relationships. *Proc. 1st. Int. Colloq. Invertebr. Pathol.*, 25-29.

HIRUMI H., HIRUMI K. et Mc INTOSH A.H., 1975. Morphogenesis of a nuclear polyhedrosis virus of the alfalfa looper in a continuous cabbage looper cell line. *Ann. N.Y. Acad. Sci., 266* : 302-326.

HOLMES I.H., RUCK R.J., BISHOP B.F. et DAVIDSON G.P., 1975. Infantile enteritis viruses : morphogenesis and morphology. *J. Virol., 16* : 937-943.

HUGER A., 1959. Histological observations on the development of crystallin inclusions of the rickettsial disease of *Tipula paludosa* Meigen. *J. Insect Pathol., 1* : 60-66.

HUGER A., 1962. Zur genese der begleitkristalle bei *Rickettsiella*-infecktionen von Insekten. *Naturwiss., 49* : 358.

HUGER A., 1964. Ein Rickettsiose der Orientalischen Schabe *Blatta orientalis* L. verursacht durch *Rickettsiella blattae* nov. sp. *Naturwiss., 51* : 1-22.

HUGER A., 1966. A virus disease of the indian rhinoceros beetle, *Oryctes rhinoceros* (Linnaeus), caused by a new type of insect virus, *Rhabdionvirus oryctes* gen. n. sp. n. *J. Invertebr. pathol., 8* : 38-51.

HUGER A. et KRIEG A., 1967. New aspects of the mode of reproduction of *Rickettsiella* organisms in insects. *J. Invertebr. Pathol., 9* : 442-445.

HUMASON G.L., 1962. "Animal tissue techniques". *W.H. Freeman and Co, San Francisco,* 468pp.

ITO S., VINSON J.W. et Mc GUIRE T.J., Jr., 1975. Murine typhus rickettsiae in the oriental rat flea. *Ann. N.Y. Acad. Sci., 266* : 35-60.

JAENSON T.G.T., 1978. Virus-like rods associated with salivary gland hyperplasia in Tsetse *Glossina pallipides*. *Trans. r. Soc. trop. Med. Hyg., 72* : 234-238.

JOHNSON P.T., 1978. Viral diseases of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Mar. Fish. Rev., 40* : 13-15.

JONES H., RAKE G. et STEARNS B., 1945. Studies on lymphogranuloma venereum. III the action of the sulfonamides on the agents of lymphogranuloma venereum. *J. Infect. Dis., 76* : 55-69.

KAWAMOTO F., KUMADA N. et KOBAYASHI M., 1977 a. Envelopment of the nuclear polyhedrosis virus of the oriental tussock moth *Euproctis subflava*. *Virology, 77* : 867-871.

KAWAMOTO F., SUTO C., KUMADA N. et KOBAYASHI M., 1977 b. Cytoplasmic budding of a nuclear polyhedrosis virus and comparative ultrastructural studies of envelopes. *Microbiol. Immunol., 21* : 255-265.

KELLEN W.R., LINDEGREN J.E. et HOFFMANN D.F., 1972. Developmental stages and structure of a *Rickettsiella* in the Navel Orangeworm, *Paramyelois transitella* (Lepidoptera, Phycitidae). *J. Invertebr. Pathol. 20* : 193-199.

KITAJIMA E.W., COSTA C.L. et SA C.M., 1978. *Baculovirus*-like particles in two Aphid species. *J. Invertebr. Pathol., 31* : 123-125.

KORDOVA N., 1978. Chlamydiae, Rickettsiae and their cell wall defective variants. *Can. J. Microbiol., 24* : 339-352.

KRIEG A., 1955. Licht-und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Pathologie der "Lorscher Erkrankung" von Engerlingen und zur Zytologie der *Rickettsia melolonthae*, nov. spec. *Z. Naturforsch., 10 b*: 34-37.

KRIEG A., 1958. Vergleichende taxonomische, morphologische und serologische untersuchungen an insektenpathogenen Rickettsien. *Z. Natur. Forsh., 13 b* : 555-557.

KRIEG A., 1959. On the problem of crystals associated with *Rickettsiella* infections. *J. Insect Pathol., 1* :95.

KRIEG A., 1964. Immunofluoreszenz-mikroskopische untersuchungen im zusammenhang mit der Rickettsiose von *Melolonthae spp. Z. Naturforsch. 19 b* : 487-490.

KRIEG A., 1965. Uber eine neue Rickettsie aus Coleopteren : *Rickettsiella tenebrionis* nov. sp. *Naturwiss., 52* : 144-145.

KRINSKY W.L., 1977. *Nosema parkeri* sp. n., a microsporidian from the argasid tick, *Ornithodoros parkeri* cooley. *J. Protozool., 24* : 52-56.

LANGERON P., 1949. "Précis de microscopie". *Masson, Paris,* 1430 pp.

LI J.K.K. et FOX C.F., 1975. Ultrastructural studies on the inner and outer membranes of our unsaturated fatty acid auxotroph of *Escherichia coli. J. Ultrastruct. Res., 52* : 120-133.

LOUIS C., 1969. Histochimie et ultrastructure des mycetomes et symbiotes d'*Icerya purchasi* Mask. (Homoptera-Coccoïdea-Monophlebinae). *C.R. Acad. Sci., 268, D* : 445-448.

LOUIS C. et LAPORTE M., 1969. Caractères ultrastructuraux et differenciation de formes migratrices des symbiotes chez *Euscelis plebeius* (Hom. Jossidae). *Ann. Soc. ent. Fr. (N.S.), 5* : 799-809.

LOUIS C., CROIZIER G. et MEYNADIER G., 1977 a. Trame cristalline des inclusions protéiques chez une *Rickettsiella. Biol. Cell., 29* : 77-80.

LOUIS C., MOREL G., NICOLAS G. et KUHL G., sous presse. Etude comparée des caractères ultrastructuraux de deux rickettsies d'arthropodes révélés par cryodécapage et cytochimie. *J. Ultrastruct. Res.*

LOUIS C., YOUSFI A., VAGO C. et NICOLAS, 1977 b. Etude par cytochimie et cryodécapage de l'ultrastructure d'une *Rickettsiella* de crustacé. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 128, B* : 177-205.

LUOTO L., 1953. A capillary agglutination test for bovin Q-fever. *J. Immunol., 71* : 226-231.

McEWEN F.L., 1963. Cordyceps infections. In "Insect pathology", (Steinhaus E.A., ed.). *Academic press, New York-London, 2* : 273-290.

MAILLET P.L., 1971. Observations ultrastructurales et biologiques sur des microorganismes de type rickettsien trouvés chez divers homoptères Auchenorhynques. *Bull. Biol. Fr. et Belg., 105* : 95-111.

MAINS E.B., 1950. The genus *Gibellula* on spiders in North America. *Mycologia, 42* : 306-321.

MAINS E.B., 1954. Species of *Cordyceps* on spiders. *Bull. Torrey botan club, 81* : 492-500.

MARAMOROSCH K., HIRUMI H., KIMURA M. et BIRD J., 1975. Mollicutes and Rickettsia-like plant disease agent (Zoophytomicrobes) in insects. *Ann. N.Y. Acad. Sci., 266* : 276-292.

MARTIGONI M.E. et IWAI P.J., 1977. A catalog of viral diseases of insects and mites. *U.S.D.A. Forest Service, General Technical Report,* PNW 40, 28 pp.

MARTOJA R. et MARTOJA-PIERSON M., 1967. Initiation aux techniques de l'histologie animale. *Masson, Paris*, 345 pp.

MEJBAUM W.Z., 1939. Uber die bestimmung kleiner pentosemengen, insbesonder in derivaten der adenylsaüre. *Z. Physiol. Chem., 258* : 117-120.

MEYNADIER G. et MONSARRAT P., 1969. Une rickettsiose chez une cétoine de Madagascar. *Entomophaga, 14* : 401-406.

MEYNADIER G., LOPEZ A. et DUTHOIT J.L., 1974. Mise en évidence de Rickettsiales chez une araignée *(Argyrodes gibbosus* Lucas), Araneae, Theridiidae. *C.R. Acad. Sc. Paris, 278 , D* : 2365-2367.

MILBURN N.S., 1966. Fine structure of the pleomorphic bacteroïds in the mycetocytes and ovaries of several genera of cockroaches. *J. Insect Physiol., 12* : 1245-1254.

MILLOT J., 1926. Contribution à l'histophysiologie des Araneides. *Supp. Bull. biol. France et Belgique, 8*, 238 pp.

MOKHTAR-MAAMOURI F., LAMBERT A., MAILLARD C. et VAGO C., 1976. Infection virale chez un Plathelminthe parasite. *C.R. Acad. Sci. Paris, 283 D* : 1249-1251.

MONNERON A. et BERNHARD W., 1966. Action de certains enzymes sur des tissus inclus en Epon. *J. Microscopie, 5* : 697-714.

MONSARRAT P., 1978. Contribution à l'étude du virus d'*Oryctes rhinoceros* L. et de son impact écologique. Thèse *Doct. Sci. Nat., Montpellier,* 209 pp.

MOOR H. et MUEHLETHALER K., 1963. Fine structure in frozen-etched yeast cells. *J. Cell. Biol., 17* : 609-628.

MOREL G., 1972. Recherches sur l'action de bactéries entomopathogènes chez le scorpion *Buthus occitanus* Am. Thèse *3è cycle, Montpellier,* 166 pp.

MOREL G., 1975. Un virus cytoplasmique chez le scorpion *Buthus occitanus* Amoreux. *C.R. Acad. Sci. Paris, 280* : 2893-2894.

MOREL G., 1976. Studies on *Porochlamydia buthi* g.n., sp. n. and intracellular pathogen of the scorpion *Buthus occitanus. J. Invertebr. Pathol., 26* : 167-175.

MOREL G., 1977. Etude d'une *Rickettsiella* (Rickettsie) se développant chez un arachnide , l'araignée *Pisaura mirabilis. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 128, A* : 49-59.

MOREL G., 1978. Isolement de deux Chlamydiales (Rickettsies) chez un arachnide : l'araignée *Pisaura mirabilis* Cl. *Experientia, 34* : 344-345.

MOREL G. et DUTHOIT J.L., 1974. Un microorganisme intracellulaire de type rickettsien chez le scorpion *Buthus occitanus* Amoreux. *C.R. Acad. Sc. Paris, 278, D* : 1991-1994.

MOREL G., BERGOIN M. et VAGO C., 1977. Mise en évidence chez l'araignée *Pisaura mirabilis* Cl. d'un nouveau type de virus apparenté aux *Baculovirus*. *C.R. Acad. Sci. Paris, 285* : 933-935.

MOREL G., VEYRUNES J.C. et VAGO C., 1974. Infection virale chez la rickettsie du scorpion *Buthus occitanus* Amoreux. *C.R. Acad. Sc. Paris, 279, D*:1365-1367.

MULLER-KOGLER E., 1958. Eine Rickettsiose von *Tipula paludosa* Meig. durch *Rickettsiella tipulae* nov. sp. *Naturwiss., 45* : 248.

NEMOTO H. et AOKI J., 1975. *Entomophtora floridana* (Entomophtorales : Entomophthoracae) attacking the Sugi spider mite, *Oligonychus hondoensis* (acarina, tetranychidae) in Japon. *Appl. Entomol. Zool., 10* : 90-95.

ORMIERES R. et BAUDOIN J., 1969. Proposition de *Doliospera* N.G. pour l'eugregarine *"Acanthospora repelini"* Léger, 1897, parasite d'opilion. *Ann. St. Biol. Besse, 4* : 271-279.

ORMIERES R. et BAUDOIN J., 1973. Eugregarines parasites d'opilion de la région de Besse. *Ann. St. Biol. Besse, 8* : 199-219.

OSAKI H., 1973. Electron microscopic observations of chlamydia-like microorganism in hepatopancreas cells of the Spider *Coras luctuosus*. *Acta Arachnol., XXV* : 23-36.

PAGE L.A., 1974. Chlamydiales. In "Bergey's manual of determinative bacteriology" 8 ed.(Buchanan R.E. and Gibbons N.E.) *Williams and Wilkins Co., Baltimore* : 914-918.

PAPPALARDO R. et BONAMI J.R., 1979. Infection des Crustacés marins due à un virus de type nouveau apparenté aux *Baculovirus*. *C.R. Acad. Sci. Paris, 288, D* : 535-537.

PAYNE C.C. et HARRAP K.A., 1977. Cytoplasmic polyhedrosis viruses. In "The atlas of insects and plant viruses". *Academic Press, New York San Francisco-London* : 105-129.

PFEFFERKORN E.R. et SHAPIRO D., 1974. In "Comprehensive virology". (Fraenkel-Conrat H. et Wagner R.R. eds.) *Plenum publishing corporation, New York-London, 2*, 340 pp.

PHILIP C.B., 1956. Comments on the classification of the order Rickettsiales. *Can. J. Microbiol.*, *2* : 261-270.

PINNOCK D.E., and HESS R.T., 1974. The occurence of intracellular Rickettsia-like organisms in the tsetse flies, *Glossinia morsitans*, *G. fuscipes*, *G. Brevipalpis*, *G. pallidipes*. *Acta Trop.*, *31* : 70-79.

POPOV V.L., SHATKIN A.A., AVAKYAN A.A. et PROZOROVSKY S.V., 1977. Unusual minute forms in the developmental cycle of *Halprowiae* (Chlamydiae) and their possible association with the L-transformation phenomena. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunol.*, *3* : 42-46.

REED D.K. and HALL I.M.,1972. Electron microscopy of a rod shaped noninclusion virus infecting the citrus red mite. *J. Invertebr. Pathol.*, *20* : 272-278.

ROCHA-LIMA H.da, 1916. Beobachtungen bei flecktyphusläusen. *Arch. Schiffs - U. Tropen Hyg.*, *20* : 17-31.

ROSENBERG M. et KORDOVA N., 1960. Study of intracellular forms of *Coxiella burneti* in the electron microscope. *Acta Virol.*, *4* : 52-55.

ROSENBERG M. et KORDOVA N., 1962. Multiplication of *Coxiella burneti* in Detroit 6 cell cultures. An electron microscope study. *Acta Virol.*, *6* : 176-188.

SCHACHTER J., 1978. Chlamydial infections. *N. Engl. J. Med.*, *298* : 428-435 ; 490-495 ; 540-549.

SCHARNHOST D.W., SAVING K.L., VUTURO S.B., COOKE P.H. et WEAVER R.F., 1977. Structural studies on the polyhedral inclusion bodies, virions, and DNA of the nuclear polyhedrosis virus of the cotton bollworm *Heliothis zea*. *J. Virol.*, *21* : 292-300.

SILVERMAN D.J., BOESE J.L., et WISSEMEN C.L., Jr., 1974. Ultrastructural studies of *Rickettsia prowazeki* (Rickettsiales) from louse (Pediculus humanus humanus : Anop., Pediculidae) midgut cells to feces : search for "dormant" forms. *Infect. Immun.*, *10* : 257-263.

SMIRNOFF W.A. et ACKERMANN H.W., 1977. A *Baculovirus* of the european skipper, *Thymelicus lineola* (Lepidoptera : Hesperiidae). *J. Invertebr. Pathol.*, *30* : 225-231.

SMITH K.M., HILLS G.J., MUNGER F. et GILMORE J.E., 1959. A suspected virus of the citrus red mite *Panonichus citri* (Mc Gregor). *Nature*, *184*, 70.

SPURR A.R., 1969. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.*, *26* 31-43.

STORZ J. et PAGE L.A., 1971. Taxonomy of the Chlamydiae : Reasons for classifing organisms of the genus *Chlamydia*, family Chlamydiaceae, in a separate order, Chlamydiales ord. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* *21* : 332-334.

SUMMERS M.D. et ARNOTT H.J., 1969. Ultrastructural studies on inclusion formation and virus occlusion in nuclear polyhedrosis and granulosis virus-infected cells of *Trichoplusia ni* (Hubner). *J. Ultrastruct. Res., 28* : 462-480.

SUTTER G.R. et KIRK U.M., 1968. Rickettsia-like particules in fat-body cells of Carabid beetles. *J. Invertebr. Pathol., 10* : 445-449.

TANADA Y., 1963. Epizootiology of infectious diseases. In "Insect Pathology" (Steinhaus E.A. eds.). *Academic Press, New York-London, 13* : 423-475.

VACELET J. et GALLISSIAN M.F., 1978. Virus-like particles in cells of the sponge *Verongia cavernicola* (Demospongidae, Dictyceratidae) and accompanying tissues changes. *J. Invertebr. Pathol., 31* : 246-254.

VACHON M., 1952. Etudes sur les scorpions. *Institut Pasteur d'Algérie, Alger,* 482 pp.

VAGO C., 1966. A virus disease in Crustacea. *Nature, 209* : 1290.

VAGO C. et MARTOJA R., 1963. Une rickettsiose chez les gryllidae (Orthoptera). *C.R. Acad. Sci. Fr., 256* : 1045-1047.

VAGO C. et MEYNADIER G., 1965. Une rickettsiose chez le criquet pélerin *(Schistocerca gregaria* Forsk) . *Entomophaga, 10* : 307-310.

VAGO C., MEYNADIER G., JUCHAULT P., LEGRAND J.J., AMARGIER A. et DUTHOIT J., 1970. Une maladie rickettsienne chez les crustacés isopodes. *C.R. Acad. Sci. Paris, 271* : 2061-2063.

VIEU J.F., CROISSANT O. et DAUGUET C., 1965. Structure des bactériophages responsables des phénomènes de conversion chez les *Salmonella. Ann. Inst. Pasteur, 109* : 160-166.

WAGNER R.R., 1974. In "Comprehensive virology" (Fraenkel-Conrat H. et Wagner R.R. eds.) *Plenum publishing corporation, New York-London, 4,* 347 pp.

WEISER J., 1957. Cizopasníci nêkterých druhů hmyzu ssajícího krev (Parasites de quelques espèces d'insectes hematophages - En Tchéque). *Čsl. Parasitol., 4* : 355-358.

WEISER J. et ŘEHÁČEK J., 1975. *Nosema slovaca* sp. n. : A second microsporidian of the tick *Ixodes ricinus. J. Invertebr. Pathol., 26* : 411.

WEISER J. et ŘEHÁČEK J., 1976. A microsporidian form *Dermacentor reticulatus. 2nd Internationales arbeitskolloquium über "Naturherde von infektionskrankheiten in zentraleuropa". Graz* : 487-489.

WEISER J. et ZIZKA Z., 1968. Electron-microscope studies of *Rickettsiella chironomi* in the midge *Camptochironomus tentans. J. Invertebr. Pathol. 12* : 222-230.

WEISS E., 1974. *Rickettsiella*, in "Bergey's manual of determinative bacteriology. 8è ed. (Buchanan R.E. et Gibbons N.E.) *Williams and Wilkins Co., Baltimore* : 901-903.

WEYER F., 1960. Biological relationships between lice (Anoplura) and microbial agents. *Ann. Rev. Entomol., 5* : 405-420.

WIEBE M.E., BURTON P.R. et SHANKEL D.M., 1972. Isolation and characterization of two cell types of *Coxiella burneti* phase I. *J. Bacteriol. 110* : 368-379.

WILSON G.G. et BURKE J.M., 1972. A rickettsia-like organism associated with the milliped, *Ophyiulus pilosus* (New Port) (Diplopode : Iulidae). *Can. J. Microbiol., 18* : 538.

WRIGHT J.D., SJOSTRAND F.S., PORTARO J.K. et BARR A.R., 1978. The ultrastructure of rickettsia-like microorganism *Wolbachia pipientis* and associated virus-like bodies in the mosquito *Culex pipiens*. *J. Ultrastruct. Res., 63* : 79-85.

YEN J.H., 1975. Transovarial transmission of rickettsia-like microorganisms in mosquitoes. *Ann. N.Y. Acad. Sci., 266* : 152-161.

YEN J.H. et BARR A.R., 1974. Incompatibility in *Culex pipiens*. In "The use of genetics in insect control", (Pal R. et Whitten M.J. eds.) *Elsevier North Holland, 6* : 97-118.

YOTSUYANAGI Y., 1960. Mise en évidence au microscope électronique des chromosomes de la levure par une coloration spécifique. *C.R. Acad. Sci., Paris, 250* : 1522-1524.

YOUSFI A., 1976. Recherches sur la pathologie des crustacés isopodes oniscoïdes. Thèse *Doct. Spéc., Montpellier*, 159 pp.

YUNKER C.E., 1970. Worldwide research on human and animal diseases caused by tickborne viruses. *Misc. Publ. Entomol. Soc. Amer., 6* : 330-338.